UNTERSUCHUNGEN ÜBER BENCYCLANHYDROGENFUMARAT (FLUDILAT®) ALS SUBSTRAT FÜR DEN ZITRONENSÄUREZYKLUS IN RINDERLINSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
MECHTHILD GÜNTER
aus Paderborn

BONN 1980

UNTERSUCHUNGEN ÜBER BENCYCLANHYDROGENFUMARAT (FLUDILAT®) ALS SUBSTRAT FÜR DEN ZITRONENSÄUREZYKLUS IN RINDERLINSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
MECHTHILD GÜNTER
aus Paderborn

BONN 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. O. Hockwin
2. Gutachter: Prof. Dr. K. Mörsdorf

Aus der Abteilung Biochemie des Auges
(Leiter: Prof. Dr. O. Hockwin)
im Institut für experimentelle Ophthalmologie
der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. E. Weigelin)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: A. Brückner, Bonn

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546501_0030

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat.
Otto Hockwin für die Überlassung
des Themas, für seinen Rat und seine
Unterstützung bei der Ausführung
der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	9
2.	Literatur	11
2.1.	Anatomie der Linse	11
2.2.	Aufnahme von Nährstoffen in die Linse	12
2.3.	Stoffwechsel der Linse	15
2.3.1.	Allgemeine Einführung	15
2.3.2.	Kohlenhydratstoffwechsel	17
2.3.2.1.	Zitronensäurezyklus	2o
2.3.3.	Altersveränderungen im Linsenstoffwechsel	24
2.4.	Katarakt der Linse	29
2.5.	Inkubation von Linsen	31
2.6.	Fludilat ^{R}	34
2.6.1.	Chemische und physikalische Eigenschaften	34
2.7.	Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Fludilat	35
2.8.	Fludilat in der Ophthalmologie	38
2.8.1.	Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels der Linse durch Fludilat	39
3.	Material und Methoden	42
3.1.	Verwendete Lösungen	42
3.1.1.	Kinsey-B-Ringer	42
3.1.2.	Inkubationslösungen	42
3.1.2.1.	TC-199-Inkubationslösung	44
3.1.2.2.	Fludilat-Inkubationslösung	44
3.1.2.3.	Na_2-Fumarat-Inkubationslösung	45
3.1.3.	Hydrazinpuffer	45
3.2.	Tiermaterial, Beschaffung und Präparation	46
3.3.	α-Ketoglutarat-Vorversuche	46

		Seite
3.4.	Versuchsablauf	47
3.4.1.	Inkubation	47
3.4.2.	Herstellung des Linsenxtraktes	48
3.5.	Enzymatische Bestimmung von Metaboliten	5o
3.5.1.	α-Ketoglutaratbestimmung	52
3.5.2.	L-Malatbestimmung	54
3.6.	Statistische Auswertung und Ergebnisse	56
3.6.1.	Statistische Verfahren	56
3.6.1.1.	T-Test	56
3.6.1.2.	Regression	58
3.6.2.	Ergebnisse der Linsenfrischgewichtsänderungen nach Vorinkubation	59
3.6.3.	Ergebnisse der enzymatischen Analyse	6o
4.	Diskussion	68
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literaturverzeichnis	72
7.	Lebenslauf	87

1.Einleitung und Problemstellung

Untersuchungen an Rinderlinsenhomogenaten (Korte et al., 1977 b; Hockwin et al., 1977) und an intakten Rinderlinsen, die durch Verarmung endogener Substrate eine Veränderung der physiologischen Gleichgewichtslage des Stoffwechsels aufwiesen (Hockwin et al., 1978), konnten nachweisen, daß Bencyclanhydrogenfumarat den Kohlenhydratstoffwechsel zu aktivieren vermag.

Bencyclanhydrogenfumarat ist ein N-3-(1-Benzyl-cycloheptyl-oxy)-propyl-N, N-dimethyl-ammoniumhydrogenfumarat. Das Molekül hat gewisse Salzeigenschaften, wobei der Bencyclananteil als kationischer Partner mit dem anionischen Fumarsäurerest verbunden ist. Der Substanz kommt vasoaktive Bedeutung zu (Denk, 1973). Einige der vasoaktiven klinischen Effekte gehen mit einer Besserung der Stoffwechsellage einher (Hapke, 1974; Gärtner et al., 1974; Kiss et al., 1972; Mányai, 1974; Schanzenbächer, 1976), die sich vielfach als Aktivierung des Kohlenhydratabbaus interpretieren läßt (Spaan & Hild, 1974).

Die Untersuchungen an Linsen regten eine Diskussion darüber an, ob der Fumarsäureanteil des Bencyclan für die beobachteten Veränderungen biochemischer Parameter des Kohlenhydrat-und Energiestoffwechsels eine Bedeutung haben könnte. Korte et al., (1977 a) führten den Nachweis, daß die Fumarase den Fumarsäurerest des Moleküls umzusetzen vermag. Die Substrataffinitäten des Enzyms lagen in der Größenordnung von $K_m = 1{,}3 \times 10^{-3}$ M, sie zeigten keine Abhängigkeit von der kationischen Komponente. Diese Ergebnisse bestärkten die Annahme, daß der Fumarsäurerest des Bencyclan als Substrat für den Zitronensäurezyklus Bedeutung haben könnte (Hockwin, 1977; Hockwin et al., 1978).

Die Beteiligung des Zitronensäurezyklus am Kohlenhydratstoffwechsel der Linse war lange Zeit umstritten (Leinfelder & Christiansen, 1952; Kinoshita, 1955; Kinoshita & Wachtl, 1958). Frühe Hinweise für seine Existenz wurden von Fischer (1934),

Huysmann & Fischer (1941), Ely & Robbie (195o), Heinrichs & Gehrsitz (1951), Harris et al., (1953), Heinrichs & Harris (1956) und von Hockwin (1956) erbracht. Auf seine Bedeutung wurde von Hockwin et al., (1956) und Hockwin (1961) wiederholt hingewiesen und der mögliche Anteil des Zitronesäurezyklus am Energiehaushalt der Linse ermittelt (Hockwin & Korte, 1968; Blum, 1969; Hockwin et al., 1969; Murata & Hockwin, 1969; Kuck, 197o; Radetzky, 197o; Hockwin et al., 1971; Korte & Hockwin, 1972). Die Ergebnisse von Trayhurn (1972) und Trayhurn & Heyningen (1971 a, 1973) bestätigen das Funktionieren des Zitronensäurezyklus in Linsen und seine Beteiligung an den energiebereitstellenden Prozessen.

Harris et al., (1951, 1953, 1954 a, b) veränderten die physiologischen Gleichgewichtseinstellungen der intakten Linsen, indem die Inkubation nicht mehr unter optimalen Bedingungen vorgenommen wurde. Hockwin et al., (1978) erzielten die Störung von Stoffwechselgleichgewichten durch Krebs-Ringer-Lösung ohne Zusatz von Glucose, wodurch die Linse gezwungen wird, ihre Kohlenhydratreserven aufzubrauchen. Diese bestehen im wesentlichen aus Glucose, Fructose und dem Glykogen (Hockwin & Schäfer, 1964; Hockwin et al., 1969; Hockwin, 1973).

Nachdem es gelungen war, mit dem Modell der substratverarmten Linse experimentelle Voraussetzungen zu schaffen, die Untersuchungen zur Aktivierung des Linsenstoffwechsels auch an ganzen Linsen gestatten (Hockwin et al., 1978), wie es sonst nur an Homogenaten möglich war, sollte nun in dieser Arbeit geprüft werden, ob die verstärkte Metabolisierung des Fumarsäureanteils des Bencyclan selbst in Gegenwart von Glucose zu Veränderungen im Gehalt von Metaboliten des Zitronensäurezyklus führt. Zu diesem Zweck wird der Gehalt der Linsen an Malat, welches aus dem Fumarat durch das Enzym Fumarase direkt gebildet wird, und an α-Ketoglutarat, das erst nach Durchlaufen mehrerer Zwischenstufen aus dem Fumarat entstehen kann, unter verschiedenen Inkubationsbedingungen bei paarweisen Versuchsansätzen bestimmt, wobei eine Linse jeden Paares dem Einfluß des **Bencyclanhydrogenfumarat ausgesetzt wurde.**

2. Literatur

2.1. Anatomie der Linse

Die Linse ist ein durchsichtiger, bikonvexer Körper ektodermaler Herkunft, der, umspült von Kammerwasser, zwischen Iris und Glaskörper liegt. Ihre dem Glaskörper anliegende Hinterfläche ist stärker gewölbt als die Vorderfläche.

Die Linse ist von einer elastischen, semipermeablen, in der Regel homogenen Kapsel umgeben (Capsula lentis), an deren äußerster Schicht, der Zonulalamelle, seitlich die Fasern des Aufhängeapparates, die Zonulafasern, sich pinselartig aufsplitternd befestigt sind. Die Zonula Zinii entspringen in der Gegend der vorderen Netzhautgrenze und ziehen teils von den dazwischenliegenden Ziliartälern zur Linse. Dadurch wird eine Verbindung der Linse zum Ziliarmuskel hergestellt, die für die Naheinstellung des Auges von größter Bedeutung ist (Bucher, 1973).

An der Vorderseite der Linse wird die Kapsel im Laufe des Lebens etwa 3x so dick wie an der Hinterseite (5 µm), weil dort das sie bildende Epithel erhalten bleibt. Das Wachstum der Linse erfolgt von dem sogenannten Beckerschen Kernbogen aus, der am Äquator dicht unter der Kapsel gelegen ist. Dieser besteht aus einschichtigem kubischen Linsenepithel, welches die Fähigkeit zur Mitose bis ins hohe Lebensalter hinein behält. Das Wachstum der Linse führt zu einer Umbildung des Linseninneren durch Apposition immer neu hinzukommender Linsenfasern: Die vorhandenen Linsenfasern verdichten sich unter Wahrung der optischen Homogenität etwa vom 3.Lebensjahrzehnt ab im Zentrum zum sogenannten Alterskern, wodurch die akkommodativ verformbare Rindensubstanz laufend abnimmt (Waley, 1969).

Da das Ausmaß der Akkommodation von der Fähigkeit abhängig ist, die Linsengestalt zu verändern, d.h. die Linsenellipse (Ferneinstellung) durch Kontraktion des Ziliarmuskels und damit Erschlaffung der Zonulafasern zur Linsenkugel

(Naheinstellung) umzuformen, läßt auf Grund der Sklerosierung die Akkommodationskraft mit dem Alter nach (Hollwich, 1976).

Die Linse enthält keine Nerven und Blutgefäße. Sie ist anatomisch isoliert. Ihre Ernährung und der Abtransport ihrer Stoffwechselprodukte erfolgt durch das Kammerwasser, das sie umspült. Die Linse stellt für biochemische Untersuchungen ein besonders interessantes Objekt dar, da sie ein in sich geschlossenes Organ mit einem relativ autonomen Wachstum ist (Hollwich, 1976).

2.2. Aufnahme von Nährstoffen

Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, daß die Linse einen Stoffwechsel besitzt, der sie befähigt, Stoffe aus dem Kammerwasser aufzunehmen und sie zum Aufbau ihrer Substanzen zu verwenden. Die Zusammensetzung des Kammerwassers ist noch nicht ganz genau bekannt. Man kann es nämlich nicht als ein Hauptfiltrat bzw. Dialysat des Blutes ansehen, da ein Regulationsmechanismus, die sogenannte Blutkammerwasserschranke, den Austausch der meisten Substanzen beeinflußt (Hockwin, 1971).

Der Übertritt einer Substanz vom Kammerwasser in die Linse ist von verschiedenen Faktoren abhängig: z.B. der Eigenschaft des übertretenden Moleküls, der zu penetrierenden Linsenkapsel, des Linsenepithels und der Linsenfasermembranen. Ferner wird noch Energie benötigt, um die Resorption bestimmter Stoffe aus den die Linse umgebenden Nährmedien zu ermöglichen (Salminen et al., 1977).

Auf einige wichtige Transportmechanismen der Linse soll im folgenden kurz eingegangen werden. Das Kationentransport-System ist im Linsenepithel gelegen. Die Linse enthält wesentlich mehr Kalium und das Kammerwasser mehr Natrium, d.h. Natriumionen werden gegen einen Konzentrationsgradienten aktiv durch die

Linsenkapsel in das umgebende Nährmedium transportiert. Wie auch an anderen Zellmembranen ist der Übertritt von Natriumionen eng mit einem Austausch von Kaliumionen verbunden. Solange äquivalente Mengen von K^+ gegen Na^+ ausgetauscht werden, dient dieses Regulationssystem auch zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes der Linse. Die Natriumkonzentration ist ein empfindlicher Indikator für die Stoffwechsellage der Linse (Harris & Gehrsitz, 1951; Harris et al., 1953; Harris et al., 1954 a, b; Heinrichs & Harris, 1956; van Heyningen, 1969; Trayhurn & van Heyningen, 1972). Die für den "Pump-Mechanismus" notwendige Energie wird in der Linse hauptsächlich durch die Glykolyse in Form der Bereitstellung von ATP geliefert (Trayhurn & van Heyningen, 1972).

Bonting et al. (1963) haben nachgewiesen, daß auch in der Linse die Na- K-aktivierbare ATPase, welche unter Energieabgabe ATP hydrolytisch spaltet, vorhanden ist, und ihre Konzentration proportional dem entsprechenden Na^+- und K^+- Transport ist. Einige andere Ionen diffundieren passiv zwischen Linse und Kammerwasser.

Auch die Resorption von Aminosäuren aus dem Kammerwasser ist ein Prozeß, der Stoffwechselenergie erfordert. Die Konzentrationen von Aminosäuren in Rinderlinsen sind größer als die in den umgebenden Medien, besonders hoch ist das Konzentrationsverhältnis für die sauren Aminosäuren (Dardenne & Kirsten, 1962). Nur bei der Aminosäure Glutamin ist die Konzentration in der Linse niedriger als im umgebenden Medium (Trayhurn & van Heyningen, 1973).

Entsprechend der Klassifizierung der Aminosäuren ist über 3 Transportmechanismen, und zwar für saure, basische und neutrale Aminosäuren berichtet worden (Kinsey, 1965 a). Hochwin et al. (1973 b) untersuchten die Durchlässigkeit der isolierten Rinderlinsenkapsel für Aminosäuren und wasserlösliche Proteine. In physiologischer Kochsalzlösung weist die Linsenkapsel eine negative Ladung auf, so daß sie unter diesen Bedingungen für

elektropositive Kolloide durchlässiger ist. Der Durchtritt basischer Aminosäuren wie Histidin, Lysin und Arginin wird daher begünstigt. Neutrale und saure Aminosäuren, die bei physiologischem pH negative Ladungen tragen, durchdringen die Linse gegen ein elektrisches Potential.

In Übereinstimmung mit François und Rabaey (1958) fanden Hockwin et al., (1973 b), daß Proteine der γ-Elektrophoresefraktion die Linsenkapsel penetrieren können. Das γ-Kristallin wird hauptsächlich während des embryonalen Lebens produziert, so daß es als embryonale Eiweißfraktion angesehen wird. Die großen Moleküle des α-Kristallins vermögen die Linsenkapsel nicht zu passieren.

Im allgemeinen werden Kohlenhydrate durch trägergebundenen Transport, freie Diffusion oder durch beide Mechanismen gemeinsam in die Linse aufgenommen. Der Vergleich des Durchtritts einiger nicht substituierter Monosaccharide läßt verschiedene Transportmechanismen annehmen. Glucose und Xylose penetrieren die Linse durch erleichterte Diffusion. Dabei wird die Flußrate der Substanzen durch die Kapazität des Trägers begrenzt. Die Glucose wird bei der Aufnahme in die Linse phosphoryliert (van Heyningen, 1969). Entkapselung der Linse mit Entfernung der epithelialen Zellen hebt den Glucose-Transport nicht auf, so daß die erleichterte Diffusion sowohl im Epithel als auch an den einzelnen Linsenfasermembranen stattzufinden scheint (Aviram et al., 1966). D-Fructose und D-Arabinose gelangen durch einfache Diffusion in die Linse. Aus Versuchen von Lütkes (1979) geht hervor, daß auch die phosphorylierte Fructose in das Innnere der Linse einzudringen vermag.

Die Aufnahme von Nährstoffen in die Linse und die Abgabe von Abfallprodukten des Stoffwechsels an das Kammerwasser, wie z.B. Milchsäure, ist eng mit einem intakten Linsenstoffwechsel verbunden. Die Linse stellt ein integriertes System dar, in welchem der Ein- und Austritt der Substanzen von osmotischer Regulation abhängig ist. Es findet ein enges Zusammenspiel zwischen Ener-

giefreigabe im Stoffwechsel und Verwendung der Energie bei aktiven Transportmechanismen statt.

2.3. Stoffwechsel der Linse

2.3.1. Allgemeine Einführung

Im Laufe des Lebens unterliegt der Linsenstoffwechsel unterschiedlichen Anforderungen, denen er sich jeweils anpassen muß. Seine Funktion ändert sich mit dem Lebensalter und mit der Geschwindigkeit des Wachstums der Linse, das bei Tieren in der ersten Lebenszeit sehr schnell verläuft. Dies äußert sich auch in einer Gewichts- und Volumenzunahme, die mit dem Alter abnimmt (Schmutter, 1961). Zu Beginn des Lebens wird also viel Stoffwechselenergie, die hauptsächlich aus der Glycolyse bereitgestellt wird, für synthetische Prozesse, d.h. zur Neubildung von linsenspezifischen Eiweißkörpern, die sich als Linsenfasern appositionell den vorhandenen auflagern, gebraucht (Müller et al., 1964).

Mit zunehmendem Alter überwiegt der Erhaltungsstoffwechsel. Er ist dafür verantwortlich, daß die Linse ihre Transparenz behält. Voraussetzung für die Durchsichtigkeit und Klarheit ist eine ausgeglichene Energiestoffwechselbilanz und die Aufnahme von notwendigen Nährstoffen in die Linse. Werden z.B. der Linse keine essentiellen Aminosäuren wie Tryptophan, Threonin usw. angeboten, entstehen Linsentrübungen. Wird nicht genügend Energie für die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten, z.B. wie für Na^+ und K^+, geliefert, so quillt die Linse durch Wasseraufnahme (Hockwin, 1971; Harris & Gehrsitz, 1951; Harris et al., 1954 a).

Neben Wachstums- und Erhaltungsstoffwechsel gibt es auch einen Funktions- oder Aktionsstoffwechsel, wie durch Versuche von Kleifeld u.a. (Kleifeld, 1953; Kleifeld et al., 1955 b) sichergestellt wurde. Akkommodation und damit verbundene Inhaltsver-

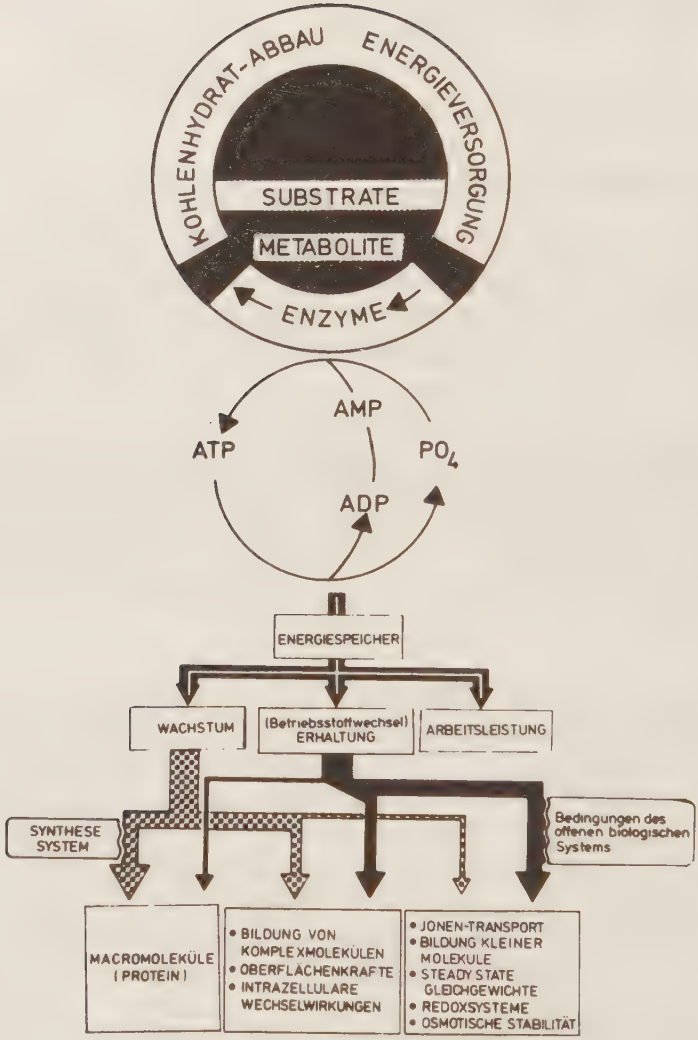


Abbildung 1:
Allgemeiner Stoffwechsel der Linse (Hockwin et al., 1976)

schiebungen in den Linsenfasern sind energieverbrauchende Vorgänge. Untersuchungen an elektrisch gereizten Schweinelinsen ergaben bei der intracapsulären Akkommodation einen Abfall von Glucose, Milchsäure und energiereichen Phosphaten, während der Sauerstoffverbrauch aus der Nährlösung im Vergleich zur Kontroll-, d.h. der ruhenden Linse zunahm. Jedesmal, wenn die Linse ihre Brechkraft änderte, sank auch der Gehalt an Glutathion, welches ein wichtiges Redoxsystem in der Linse darstellt.

Eine Schwierigkeit bei der Erforschung des Linsenstoffwechsels stellt die morphologische Differenzierung seiner Qualität und Quantität dar. Die dem Kammerwasser benachbarten Linsenfasern, die der Rindenzone, besitzen die höchste Stoffwechselintensität; die Anteile des Linsenkerns sind jedoch nicht ganz inaktiv. Kleifeld et al. (1968) bewiesen dies, indem sie hohe Enzymaktivitäten der Glucose- 6 Phosphatdehydrogenase und Malatdehydrogenase im Epithel und in der Peripherie nachweisen konnten. Die Kapsel zeigte überhaupt keine Enzymaktivitäten. Eine Ausnahme bildet nach Dardenne und Drechsler (1961) die Milchsäurehydrogenase, deren Aktivität im Kern höher als in der Rinde ist.

Die meisten Untersuchungen über den Linsenstoffwechsel werden am Tierauge durchgeführt. Da z.B. der Nukleinsäure- und der Proteinstoffwechsel verschiedener Spezies recht unterschiedlich sind, stellt sich immer die Frage, in welchem Ausmaß man von diesen Ergebnissen auf die menschliche Linse schließen kann.

2.3.2. Kohlenhydratstoffwechsel

Der normale Linsenstoffwechsel gewährleistet unter verschiedenen Bedingungen eine ausreichende energetische Versorgung des Organs. Wie aus den vorangegangenen Ausführungen zu ersehen ist, findet die wesentliche Energiebereitstellung im Kohlenhydratstoffwechsel statt.

Die Linse enthält einen geringen Teil Glykogen, welcher in ihr selbst gebildet worden sein muß, da die Linsenkapsel für das Glykogenmolekül undurchlässig ist (Hockwin & Schäfer, 1963). Glykogen stellt eine besonders vorteilhafte Speicherform für Glucose dar, da es als Makromolekül nahezu osmotisch inaktiv ist. Durch Spaltung der Glykosid-Bindungen mit Hilfe der Phosphorylase wird Glucose geliefert, die dann hauptsächlich über den Embden-Meyerhof-Weg abgebaut wird (Buddecke, 1971).

Die Glucose wird zum größten Teil aber aus dem Kammerwasser bezogen und bei der Aufnahme in die Zellen mit Phosphorsäure am C-Atom 6 verestert. Diese Reaktion wird durch die Hexokinase katalysiert, die durch ihre niedrige Aktivität in der Linse bereits einen Kontrollmechanismus für den Glucoseabbau darstellt (Kuck, 197o; Hockwin, 1971).

Man kennt heute 5 Kohlenhydratabbauwege: Glykolyse, Pentosephosphatweg, Sorbitolweg, α-Glycerophosphatweg und Citratcyclus (Buddecke, 1971). Auf Grund von Untersuchungen an Kaninchenlinsen mit 14 C-Glucose errechneten Kinoshita und Wachtl (1958), daß ungefähr 8o % des Glucosemetabolismus über die Glykolyse und 1o- 14 % über den Pentoseshunt verlaufen; nur wenige Prozent entfallen auf die anderen Kohlenhydratabbauwege. Hockwin und Korte (1968) fanden für den Pentoseshunt nur eine Beteiligung von 5%, was durch Versuche von Blum (1969) bestätigt wurde.

In der Glykolyse (Abb.2) wird das Glucose-6-Phosphat zuerst zu Fructose-6-Phosphat isomeriert, welches durch die Phosphofructokinase und ATP zu Fructose-1, 6-Diphosphat phosphoryliert wird. Die Phosphofructokinase ist ein Schrittmacherenzym der Glykolyse, weil hohe ATP- und Citratkonzentrationen ihre Aktivität hemmen (Rückkopplungsmechanismus). Um in der Linse diesen Engpaß zu umgehen, bot Lütkes (1979) im Nährmedium Fructose-1, 6-Diphosphat in $1o^{-2}$ M Konzentration an. Der Gehalt dieser Substanz und des Laktats stieg signifikant an, was auf eine Metabolisierung der angebotenen Substanz in der Glykolyse schlies-

sen läßt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Korte & Hockwin (1978 b), welche nach Zusatz von $1o^{-4}$ M Fructose- Diphosphat zum Homogenat einen Anstieg des ATP-Gehalts in den verarmten Linsenhomogenaten verzeichneten. Rinderlinsenrindenhomogenate zeigten eine geringere ATP-Zunahme.

Der weitere Glucoseabbau verläuft über Triosephosphatverbindungen und Substratkettenphosphorylierung bis zum Pyruvat, das unter anaeroben Bedingungen weiter zum **Laktat** reduziert wird. Zieht man eine Bilanz der ATP-Bildung im Verlauf der Glykolyse, so werden pro Mol Glucose 2 Mole ATP verbraucht und 4 Mol ATP gebildet. Eine Besonderheit im Kohlenhydratstoffwechsel der Linse besteht hier darin, daß sie auch in Gegenwart von Sauerstoff Milchsäure bilden kann.

Der Pentosephosphatweg konkurriert mit der Glykolyse um das Substrat Glucose-6-Phosphat. Unter anaeroben Bedingungen sowie unter Hemmung mit KCN kommt es zu einer Aktivitätssteigerung des Pentoseshunt auf ungefähr 2o% gegenüber 3 - 6% unter der normalen 7%-igen Sauerstoffspannung und KCN-freien Bedingungen (Hockwin & Korte, 1968; Blum, 1961). Die Bedeutung des Pentosephosphatzyklus liegt im wesentlichen in der Bereitstellung von Ribosen für die Nukleinsäuresynthese sowie von 2 Mol $NADPH_2$ pro Mol Glucose, welches als Coenzym für die Eiweißsynthese die Reduktion von oxidiertem Glutathion und den Lipoidstoffwechsel notwendig ist (Kuck, 197o). Für die Energiegewinnung ist dieser Abbauweg unwesentlich, da weder ATP verbraucht noch gewonnen wird. In der Produktion von CO_2 ist er jedoch 6 mal aktiver als der Zitronensäurezyklus (Kinoshita, 1955). Die Endprodukte des Pentoseshunt, Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat, können je nach Stoffwechsellage der Glykolyse zugeführt werden.

Der Sorbitolweg ist eine Transformation von Glucose in Fructose. Beim Abbau der Glucose über das Sorbitol können phosphorylierte Kohlenhydrate gewonnen werden, ohne daß die ersten Schritte der Glykolyse durchlaufen werden müssen. Wird der Linse z.B. im

Nährmedium Monojodessigsäure angeboten, was u.a. die anaerobe Glykolyse blockiert, so wird ein erhöhter Gehalt an Fructose und Fructose-6-Phosphat gefunden (Radetzky, 197o). Wegen der räumlichen Nachbarschaft zum Pentosephosphatweg kommt der Sorbitolweg als ein möglicher NADP-Regenerator für den wegen des geringen Fettstoffwechsels der Linse nicht voll ausgelasteten Pentoseshunt in Betracht (Schmack et al., 1963).

Die Bedeutung des α-Glycerophosphatweges liegt in dem Transport des $NADH_2$ vom Zytoplasma in die Mitochondrien. Wenn eine Linse in einem Nährmedium mit $^{32}PO_4^{-3}$ und Glucose inkubiert wird, findet man für die spezifische Aktivität der Zwischenstufen des α-Glycerophosphatweges relativ hohe Markierungswerte (Hockwin, 196o).

2.3.2.1. Zitronensäurezyklus

Früher wurde dem Zitronensäurezyklus in der Linse kaum Bedeutung zugemessen. Seine Beteiligung am Kohlenhydratstoffwechsel der Linse war sogar lange Zeit umstritten (Leinfelder & Christiansen, 1952; Kinoshita, 1955; Wachtl & Kinoshita, 1958).
So zeigte Kinoshita (1955), daß nur ein minimaler Teil des Pyruvats zu CO_2 oxidiert wird. Tatsächlich werden nur 3 - 5 % der Glucose über den Zitratzyklus abgebaut.

Hinweise für seine Existenz wurden bereits von Fischer (1934), Ely & Robbie (195o), Ely (1951), Harris & Gehrsitz (1951), Harris et al., (1953) und Heinrichs & Harris (1956) erbracht. Die Untersuchungen ergaben, daß Pyruvat, α-Ketoglutarsäure und Acetat die Glucose als Substrat für die Aufrechterhaltung eines normalen Kationen- und Wassergehalts weitgehend ersetzen können.

Trotz der gering erscheinenden 5 % abgebauter Glucose hat der Krebszyklus eine so hohe Effektivität, daß er in der Lage ist, ein Drittel der Stoffwechselenergie der Linse bereitzustellen. In der Glykolyse werden pro Molekül Glucose nur 2 Moleküle, bei

der kompletten Oxidation im Krebszyklus aber 38 Moleküle ATP gewonnen, d.h. die ATP-Ausbeute im Tricarbon-Säurezyklus ist im Vergleich zur Glykolyse etwa 2o mal so hoch (Hockwin & Korte, 1968; Blum, 1969; Hockwin et al., 1969; Murata & Hockwin, 1969; Kuck, 197o; Radetzky, 197o; Hockwin et al., 1971; Korte & Hockwin, 1972).

Der Zitronensäurezyklus hat eine zentrale Stellung im Intermediärstoffwechsel. Der glykolytische Abbau der Glucose bis zum Pyruvat ist immer eine Voraussetzung für den nachfolgenden oxidativen Abbau der Kohlenhydrate im Tricarbonsäurezyklus. In ihm münden ferner die Abbauprodukte einiger Aminosäuren, besonders die der glucoplastischen (Ely, 1951; Trayhurn, 1972; Trayhurn & van Heyningen, 1971 a), und der Fettstoffwechsel in Form der aktivierten Essigsäure ein (Ely, 1951; Werner, 1969).

Aus dem Acetyl-CoA wird der Acetylrest mit Oxalessigsäure zu Zitronensäure kondensiert. Der weitere Umsatz führt über zahlreiche Zwischenprodukte, wobei Hydratisierungen, Dehydratisierungen, Dehydrierungen und Decarboxylierungen vorkommen. Der Zitronensäurezyklus unterliegt zahlreichen Kontrollen. Die Aktivität der Zitratsynthetase wird durch den Gehalt an ATP und langkettigen Acyl-CoA-Verbindungen gesteuert. Die Isocitrat-Dehydrogenase wird durch ATP und $NADH_2$, die Succinat- und die Malatdehydrogenase werden durch hohe Oxalacetat-Konzentrationen gehemmt. Energieliefernd sind nur die Dehydrierungen der Substrate durch die Dehydrogenasen, deren H_2 über die Atmungskette oxydiert wird (Buddecke, 1971).

Die Atmungskette stellt ein Multi-Enzymsystem dar, das hintereinandergeschaltete Redoxsysteme katalysiert, die durch Wasserstoff- und Elektronenübertragung Substrat H_2 zu H_2O oxydieren. Entsprechend dem Potential der jeweils reagierenden Reaktionspartner wir die Energie in Teilbeträgen freigesetzt. Die freiwerdende Energie wird zur Hälfte für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat verwendet. Pro verbrauchtem g-Atom Sauerstoff, d.h. pro Mol oxydierter Wasserstoffe, werden

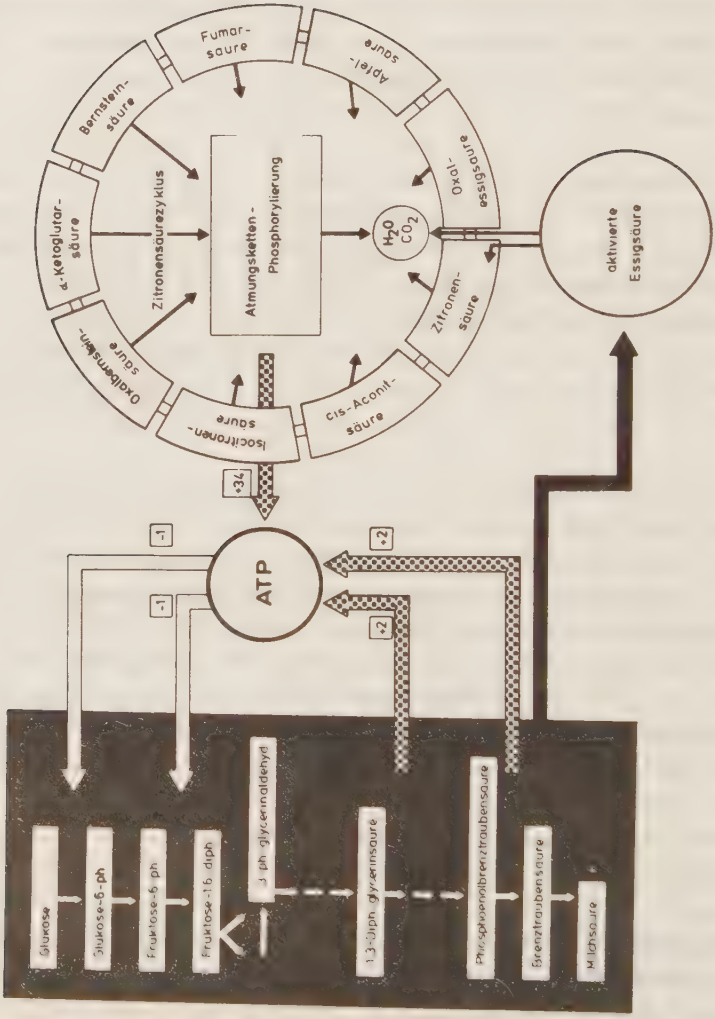


Abbildung 2: Glykolyse und Zitratzyklus,
vergleichende Darstellung der ATP-Ausbeute

3 Mol ATP gebildet (Buddecke, 1971). Ein Existieren des Cytochrom-c-Systems in der Linse konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden (Ely & Robbie, 1950).

Wenn die Nährlösung der Linse mit einem Gasgemisch gesättigt ist, dessen O_2-Partialdruck 95 % beträgt, vermehrt sich der O_2-Verbrauch der Linse; die Glykolyse und damit die Milchsäureproduktion sind herabgesetzt (Kleifeld & Hockwin, 1960). Die energiereichen Phosphate erhöhen sich unter diesen Versuchsbedingungen um 33 %, da der Glucoseabbau im Zitronensäurezyklus auf etwa 30 % der von der Linse insgesamt verbrauchten Glucose steigt (Hockwin & Korte, 1968; Hockwin et al., 1969; Hockwin et al., 1971).

In Abwesenheit von O_2 und bei Ausschaltung der für die Bereitstellung von Energie durch den Zitronensäurezyklus bedeutsamen Atmungsfermente durch KCN konnte eine Zunahme im Gehalt an Pyruvat und Zitronensäure, eine Abnahme von α-Ketoglutarsäure im Vergleich zu den Kontrollinsen festgestellt werden (Radetzky, 1970; Hockwin et al., 1969; Murata & Hockwin, 1969; Hockwin et al., 1971; Hockwin & Korte, 1972). Diese Ergebnisse lassen auf eine Abbaubehinderung im Tricarbonsäurezyklus schließen. Nach langer Einwirkung von KCN resultiert sowohl eine ATP-Abbau- als auch eine Bildungshemmung (Hockwin et al., 1956).

Pirie (1965) konnte eine Glutathionperoxidase in den Linsen verschiedener Spezies nachweisen. Dieses Enzym soll ein wesentlicher Bestandteil eines Nebenschlußsystems der Linsenatmung sein. Zusammen mit der Ascorbinsäure stellt es ein wichtiges Redoxsystem dar. Die Gegenwart von Monojodessigsäure im Nährmedium führt durch Komplexverbindung mit den SH-Gruppen zu einer Abnahme der Glutathionkonzentration in der Linse. Ebenso sinkt der Vitamin C-Gehalt, der Milchsäure- und ATP-Gehalt (Hockwin et al., 1956). Glutamin, welches durch die Glutaminase zu Glutamat metabolisiert wird, scheint ebenfalls ein bedeutendes Substrat für die Linsenatmung zu sein (Trayhurn, 1972; Trayhurn & van Heyningen, 1973).

2.3.3. Altersveränderungen im Linsenstoffwechsel

Histologisch zeigt sich der Alterungsprozeß an der Volumen-und Härtezunahme des Kerns auf Kosten der Rinde. Funktionell äußert sich dies im Nachlassen des Akkommodationsvermögens, zurückgehend auf die Sklerosierung der infolge des Wachstums der Linse immer weiter von der Oberfläche sich entfernenden Linsenfasern.

Der Altersprozeß verändert die Stoffwechselvorgänge der Linse quantitativ und qualitativ. Das biologische Altern gilt als Hauptrisikofaktor für das Entstehen von Linsentrübungen. Deswegen sind Untersuchungen möglichst vieler Stoffwechselgrößen kontinuierlich während eines längeren Lebensabschnittes notwendig. Bei den Untersuchungen muß noch berücksichtigt werden, daß beim Alterungsprozeß Stoffwechselunterschiede zwischen Linse und Kern bestehen. Der Kern ist von der ernährenden Oberfläche weiter entfernt und enthält die primären Linsenfasern, während es sich bei den Linsenfasern der Rinde um Zellen handelt, die erst vor kurzem neu synthetisiert wurden. Es besteht allerdings ein Unterschied darin, ob die Linsenfaser von einer jungen oder einer gealterten Linse gebildet wird. Nach papierelektrophoretischen Untersuchungen enthält die junge Kälberlinse in den oberflächlichen Schichten 3 trennbare Eiweißfraktionen, die Rinderlinse nur noch 2 (Hockwin, 1971; Hockwin et al., 1976).

Auch der Aminosäuregehalt des Kammerwassers von Kälbern und Rindern ist unterschiedlich. Ebenso zeigten Dardenne und Hockwin (1966), daß im Alter vermehrt Alanin, Valin, Tyrosin und Phenylalanin für die Proteinsynthese verwendet wird, während ein starkes Absinken der basischen Aminosäuren, die im wachsenden Gewebe zahlreich gefunden werden, festgestellt wurde. Für die S-haltigen Aminosäuren ist eine Abnahme der Neubildung mit zunehmendem Alter nachgewiesen (Müller et al., 1964).

Allgemein kommt es mit zunehmendem Alter zu einem **Anstieg des** wasserunlöslichen Albuminoids zu Ungunsten der übrigen wasser-

löslichen Linsenproteine.

Nach Untersuchungen von Rinder- und Hundelinsen mit Hilfe der Isoelektrofokussierung findet im Linsenkern im Verlauf des Alterns eine Umwandlung von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht in Aggregate von hohem Molekulargewicht statt, woran vornehmlich die α- und β-Kristallinfraktionen beteiligt sind (Bours et al., 1976).

Das niedermolekulare α_2-Kristallin ist bei Rinderlinsen hauptsächlich in der Rinde lokalisiert und verdichtet sich mit steigendem Alter im Kern zum hochmolekularen α_1-Kristallin. Für die hochmolekularen β-Kristallinkomponenten des Kerns (β_1 - β_8) besteht ein deutlicher Anstieg während des ganzen Lebens, während die niedermolekularen β-Elektrophoresefraktionen der Rinde im Alter fast konstant bleiben. Die alternde Linse enthält fast nur noch im Kern die γ-Kristallin-Komponente (γ_1 - γ_4). In der jungen Linse sind im Äquator ausschließlich die Komponenten γ_1 und γ_3 nachgewiesen worden, was vermuten läßt, daß die neu synthetisierten γ-Kristalline anders als die embryonalen strukturiert sind. Das prä-α-Kristallin verschwindet ganz nach einem Alter von 2 Jahren.

Prozentual nimmt während des Alterns der Rinderlinse nur die β-Kristallin-Konzentration zu, während die der α- und γ-Proteinfraktion abnimmt (Bours et al., 1976; Bours & Hockwin, 1977; Hockwin et al., 1976).

Drei verschiedene Prozesse können Ursache für die signifikanten Veränderungen sein:
1.) Postsynthetische Veränderungen, 2.) Altersveränderungen des Linsenäquators, 3.) Altersveränderungen einzelner Kristallin-Komponenten (Bours & Hockwin, 1977).

Zum Eiweißstoffwechsel gehört auch die Bereitstellung von Fermenten und Energie.

Aus vielen Untersuchungen geht hervor, daß die alternde Linse zahlreiche für den Kohlenhydratstoffwechsel wichtige Substanzen, wie z.B. Glucose, mehrere Intermediärprodukte des glykolytischen Abbaus, sowie Milchsäure vermindert enthält. Auch die Resorption von Glucose und Phosphaten aus dem Kammerwasser nimmt ab. Höchstwahrscheinlich auf Grund der Aktivitätsabnahme des Glucoseabbaus nimmt der Glykogengehalt in der Linse besonders in der Rinde zu (Hockwin & Schäfer, 1963).

Nicht alle Reaktionen der Glykolyse zeigen die gleiche Aktivitätsabnahme. Mit zunehmendem Alter entstehen wahrscheinlich charakteristische Engpässe. So wird mit zunehmendem Alter die Umsetzung von Fructose-6-phosphat in Fructose-1-6-diphosphat behindert, was auf einen Aktivitätsverlust der Phosphofructokinase zurückzuführen ist. Hockwin und Mitarbeiter fanden zusätzlich noch eine Verminderung der Substrataffinität (Michaelis-Menten-Konstante) für die beiden Schlüsselenzyme der Glykolyse: die Phosphatfructokinase und die Hexokinase (Hockwin et al., 1976). Die Ursache ist noch nicht genau geklärt, jedoch scheinen enge Beziehungen zu den Veränderungen des wasserlöslichen Proteins im Laufe des Alterns zu bestehen. Da alle Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels in der Linse in extrem niedrigen Konzentrationen vorhanden sind, können schon geringfügig verminderte Affinitäten und Enzym-Aktivitäten sich nachteilig auf das Fließgleichgewicht der Glykolyse auswirken und eine Abnahme von energiereichen Phosphaten zur Foge haben (Hockwin, 1971; Hockwin et al., 1976).

Die Reaktion Glycerinaldehydphosphat zu Phosphoglycerat ist ebenfalls behindert. Dagegen zeigt die Reaktion Fructosediphosphat zu Gycerinaldehyd-3-Phosphat und 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat einen Anstieg (Mann, 1959).

Altersbedingte Veränderungen im Pentoseshunt sind nicht ausführlich bekannt. Es wurde aber eine Aktivitätsabnahme der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase nachgewiesen (Hockwin, 1971).

Im Sorbitolweg zeigt das NAD-abhängige Enzym Sorbitoldehydrogenase, das die Reaktion des Sorbitol + NAD zu Fructose + NADH katalysiert, einen Aktivitätsanstieg im Alter, speziell in den peripheren Linsenanteilen (Hockwin et al., 1966 a). Sicherlich korreliert der altersabhängige Anstieg freier Fructose mit der Zunahme des Sorbitolweges. Für die Regulierung des Kohlenhydratabbaus über Alternativwege könnte als weiterer Auslösemechanismus auch die Veränderung im Verhältnis der reduzierten zu den oxidierten Coenzymen in Frage kommen (Hockwin, 1971).

Über einen Alterseinfluß auf den α-Glycerophosphatweg ist wenig bekannt. Der Anteil dieses Weges ist allerdings in der Linse des Rindes geringer als in der des Kalbes.

Auch der Glucoseumsatz im Zitronensäurezyklus erfährt mit fortschreitendem Alter eine Abnahme. Nach Untersuchungen von Murata und Hockwin (1969) befinden sich die höchsten Zitronensäurekonzentrationen im Linsenäquator, vorderer und hinterer Schale der Kälberlinse. Die entsprechenden Teile der Rinderlinse zeigen einen etwa 2o % niedrigeren Zitronensäuregehalt. Im Kern ist ein noch stärkerer Abfall zu verzeichnen. Auch α-Ketoglutarat, ein Intermediärprodukt des Zitronensäurezyklus, ist in der alternden Linse vermindert enthalten (W.Paulus, 1961). Die nachlassende Energiebereitstellung auf dem Wege des oxidativen Zuckerabbaus zeigt sich auch in einem herabgesetzten O_2-Verbrauch der alten Linse (Dardenne & Hockwin, 1966; Hockwin, 1971).

Die Verminderung des Glucoseabbaus während des Alterns äußert sich ebenfalls in einem Absinken des ATP/ADP-Quotienten (Kleifeld & Hockwin, 1956; Kleifeld et al., 1956).

Dieser altersbedingte Energiemangel schlägt sich auf alle energiefordernden Prozesse wie Syntheseleistung, aktive Transportmechanismen und Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles zwischen Linse und Kammerwasser nieder (Hockwin, 1971).

Wegen der verminderten Energiebereitstellung im Alter muß die

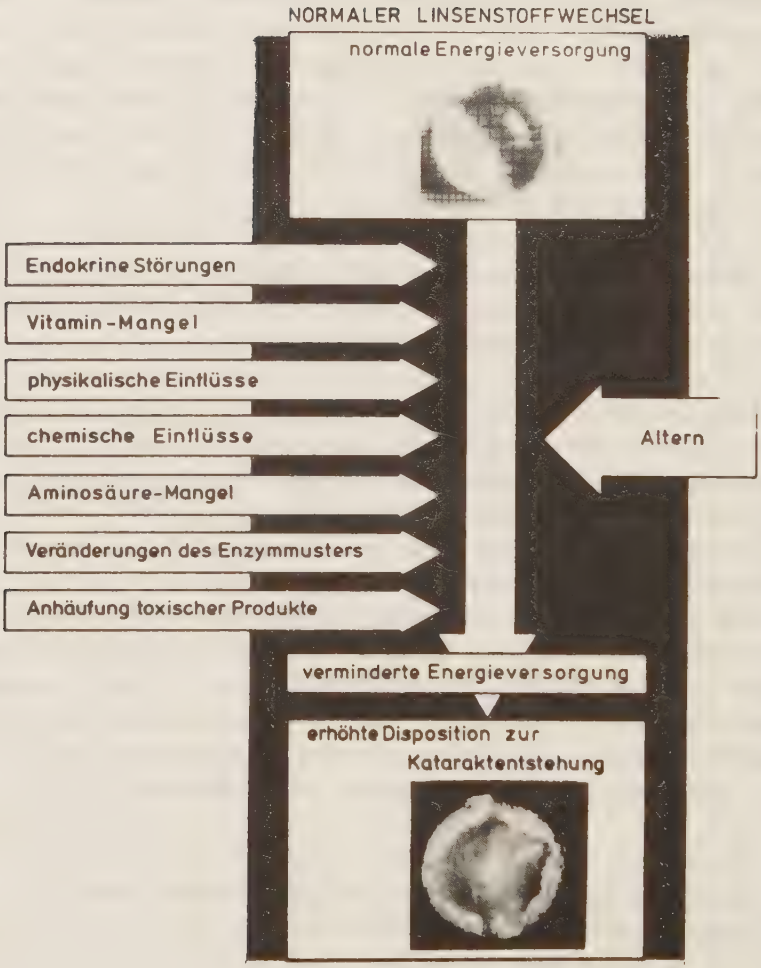


Abbildung 3: Schematisierung des Energiekonzeptes der Linsentransparenz (Hockwin et al., 1976)

Linse ihre Stoffwechselleistungen dauernd einschränken. Dadurch wird die Bereitschaft der Linse zur Ausbildung von Linsentrübungen erhöht.

2.4. Katarakt der Linse

Um ihre physiologische Funktion zu erfüllen, muß die Linse transparent sein. Die bedeutendste und am häufigsten vorkommende pathologische Veränderung der Linse ist die Störung ihrer Transparenz, die Katarakt.

Ein hoher Prozentsatz aller Menschen läßt im fortgeschrittenen Alter Trübungen der Linse erkennen. Jedoch nur ein Teil von ihnen entwickelt reife Katarakte mit Funktionseinbußen. Ferner schwankt das Manifestationsalter derartiger Trübungen in weiten Grenzen. Die Entstehung der Cataracta senilis, die bis jetzt am häufigsten untersucht worden ist, scheint multifaktorielle Ursachen zu haben, zumal schon unterschiedliche morphologische Bilder der Trübungen bekannt sind. Die 4 Haupttypen sind: 1) Wasserspalten oder Speichentrübung, 2) Cataracta cuneiformis, 3) Kernsklerose und 4) hintere subkapsuläre Trübung (Hockwin et al., 1976).

Es gibt viele klinische Beobachtungen, die bestätigen, daß Linsentrübungen das Ergebnis von mehreren sich addierenden Schädigungsereignissen sein müssen. Die Häufigkeit der Alterskatarakt ist z.B. bei Diabetikern, Glaukompatienten und unter langzeitiger Steroidtherapie größer als bei gleichaltrigen gesunden Personen (Hockwin et al., 1968).

Grundsätzlich kann man wohl bei der Additionswirkung von Noxen auf die Linse 2 pathogenetische Wege unterscheiden. Wie anhand von Tierexperimenten gezeigt wurde, können z.B. die von außen wirksamen Noxen Pilocarpin und eine sehr geringe Röntgenbestrahlung (12o R) nur dann eine Katarakt auslösen, wenn sie beide zusammen auf die Linse einwirken (Synkataraktogenese). Eine durch die Einwirkung von Naphtalin auf die Linse erzeugte Katarakt

wird durch zusätzliche Behandlung mit Pilocarpin, Histamin oder Ultraschall verstärkt (Cokataraktogenese) (Hockwin et al., 1968).

Der biochemische Hintergrund der Ursachen der Katarakt ist größtenteils noch unbekannt. Neben der bedeutenden Stellung des Kohlenhydratstoffwechsels kann die primäre Ursache auch im Eiweiß- oder Mineralstoffwechsel liegen. Bei der Entstehung der diabetischen Katarakt könnte der hohe Glucosespiegel im umgebenden Medium ein entscheidender Faktor sein (Harris et al., 1954 b).

Ein Mangel an der essentiellen Aminosäure Tryptophan führt bei jungen Ratten innerhalb kurzer Zeit zu Trübungen der subkapsulären hinteren Linsenfasern. Hier liegt also eine Störung in der Proteinsynthese vor (Ohrloff et al., 1975).

Nordmann, Mandel und Thinnes (in Müller et al., 1964) zeigten für die Galaktosekatarakt, daß schon in den allerersten Anfangsstadien eine Verminderung des Gehaltes an ATP und an Ribonucleinsäuren um etwa 15 % eintritt. Zur gleichen Zeit erfährt auch der Einbau der Aminosäuren Lysin und Methionin in das Linseneiweiß eine Hemmung von 4o bis 5o % . Demnach ist eine primäre Ursache sowohl im Kohlenhydrat- als auch im Eiweißstoffwechsel anzunehmen.

Hockwin (1962 b) untersuchte die Veränderungen des Linsenstoffwechsels nach Bestrahlung der Linsen mit hohen Dosen von Röntgenstrahlen (9o-1oo kr). Bei allen Linsen war die Aufnahme von anorganischem Phosphat direkt nach der Strahleneinwirkung vermindert. Die junge, wachsende Linse reagierte aber wesentlich empfindlicher auf die Noxe. Der Sauerstoffverbrauch und der Glutathiongehalt der jungen Linse nahmen nach der Bestrahlung sehr stark ab, während beide in der alten Linse fast konstant blieben. Im ganzen, besonders im Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel, zeigte die junge Linse Veränderungen, die denjenigen des Altersstoffwechsels ähnlich sind (Hockwin, 1961; Kleifeld & Hockwin, 1956). Fischer (1934) fand bereits, daß eine Vermin-

derung der Energiebereitstellung und eine Abnahme der Oxydoreduktionssysteme, z.B. des Glutathions, die Ausbildung einer Linsentrübung begünstigen.

Bis jetzt ist noch keine medikamentöse Therapie für die häufig beobachteten Starformen wie auch für die Alterskatarakt gefunden worden. Es ist nicht möglich, der Linse durch die Nährflüssigkeit energiereiche Phosphate zuzuführen, wodurch der Energiestoffwechsel günstig beeinflußt werden könnte. Die einzige Therapie besteht heute in der Entfernung der getrübten Linse; die optische Funktion wird von Gläsern oder Kontaktlinsen übernommen.

Relativ seltene Trübungsformen, die als Begleiterkrankung eines Grundleidens auftreten, wie die Cataracta tetanica, die Galaktosämiekatarakt der Neugeborenen, können durch Behandlung des Grundleidens, wie Gabe von AT 1o bzw. Entzug von Galaktose, günstig beeinflußt werden.

2.5. Inkubation von Linsen

Die Augenlinse eignet sich in hervorragender Weise zur Kultivierung. Die **in-vivo-Bedingungen** sind bei ihr leichter zu imitieren als bei anderen Organen, da sie unabhängig von Nervenzuleitung und Blutversorgung wächst, von einer Kapsel umgeben ist, und auch nur relativ geringe Ansprüche an die sie umgebenden Nährmedien stellt. Ferner besitzt jeder Wirbeltierorganismus 2 Augenlinsen, was besonders vorteilhaft für die **in-vitro**-Untersuchungen von exogenen Einflüssen auf die Linse ist, weil der unbehandelte Paarling als Kontrolle verwendet werden kann (Korte, 1977).

Nach Schwartz (196o a) kann erst dann von einer echten Linsenkultur gesprochen werden, wenn sie für 8 Stunden in einem Nährmedium inkubiert wurde. Diesen Zeitraum benötigt die Linse, um sich an ihre neue Umgebung zu gewöhnen. Es soll hier nur kurz

auf die verschiedenen Kulturmethoden und auf die Kriterien des physiologischen Verhaltens eingegangen werden.

In seiner Übersicht unterscheidet Schwartz 3 Methoden:

1) Ein offenes oder Durchflußsystem, in dem das Nährmedium ständig erneuert wird.

2) Ein geschlossenes System, in dem sich die ernährenden Substanzen allmählich erschöpfen, während sich die Ausscheidungsprodukte der Linse anhäufen.

3) Das sogenannte batch-System, eine Mischung aus beiden vorher genannten Systemen, in dem das Nährmedium nach bestimmten Zeitabständen erneuert wird.

Bei der Durchflußmethode von Schwartz (196o b) wird die Nährlösung begast, filtriert und mittels einer Pumpe kontinuierlich in eine Durchflußkammer gebracht, in der die Linse unter einem Mikroskop beobachtet werden kann. Thermometer, pH-Meter, Druckausgleichsvorrichtung und Redoxmeter sind in den Durchflußkreis eingeschlossen. Bei dieser komplizierten und technisch aufwendigen Durchflußapparatur bleiben die Linsen durchschnittlich 4o Stunden klar.

Bei dem geschlossenen System, wie es Merriam und Kinsey (195o) benutzten, werden die Linsen in verschiedenen Kulturgefäßen aufbewahrt und ihre Nährlösungen im temperierten Wasserbad hin- und hergeschüttelt, so daß die Linse von einem Nährmedium umgeben ist, in dem die Nährstoffe und Ausscheidungsprodukte immer gleichmäßig verteilt sind. Die Begasung erfolgt gleichzeitig für alle Kulturgefäße.

Bei dieser Apparatur kann die Nährlösung bei Bedarf ausgetauscht werden (batch-System). Die Linsen behielten bei dieser Versuchsanordnung ihre Klarheit für 14 Tage.

Bei den erwähnten Methoden wurden jeweils einige Größen bestimmt, die über die Veränderungen der Linse und ihres Stoffwechsels während der Kultivierung Auskunft geben sollten.

Einen ersten Hinweis über die Veränderung der Linse gibt bereits ihr makroskopisches Aussehen. Ist die Linse getrübt oder gefärbt, während z.B. die Kontrolle klar bleibt, dürfte der Vorgang auf die hinzugefügte zu testende Substanz zurückzuführen sein.

Nach der Beendigung der Kultur wird die Linse entnommen und sofort gewogen. Eine Gewichtszu- oder -abnahme während der Inkubation. die über das normale Maß der Kontrollen hinausgeht, spricht z.B. für eine Quellung der Linse durch Aufnahme von Wasser (Korte, 1977).

1955 benutzten Kinsey et al. zum ersten Mal als Kriterium für normales Verhalten der Linse die Mitoserate des Linsenepithels. Sie definierten sie als den prozentualen Anteil der Mitosezahl in der kultivierten Linse an der Mitosezahl in der nicht inkubierten Vergleichslinse.

Störungen im Verteilungsmuster der Kristalline können auch mit Störungen der Fermentaktivitäten einhergehen. Da die wasserlöslichen α-, β- und γ-Proteinfraktionen in einer ganz bestimmten Zusammensetzung in der Linse vorliegen, läßt eine Verschiebung des Musters eine Wirkung der zu testenden Substanz auf den Eiweißstoffwechsel erkennen.

Als weiteres Kriterium dient auch die Bestimmung der Enzymaktivitäten und der Substratkonzentrationen. So empfiehlt es sich z.B., die Konzentrationen von Zwischenprodukten des Kohlenhydratabbaus oder die Aktivität von Enzymen, die den Kohlenhydratabbau katalysieren, zu bestimmen, da nur ein intakter Kohlenhydratstoffwechsel die notwendige Energiebereitstellung für den Linsenstoffwechsel gewährleistet (Korte, 1977).

In den 1968 von Korte et al. durchgeführten Versuchen wurde ebenfalls der Gehalt an freien Adeninnukleotiden nach Inkubation sowohl im stationären als auch im Durchflußsystem bestimmt. Bei beiden Systemen nehmen nach 24-stündiger Kultivierung die energiereicheren Verbindungen (ATP) ab und die energieärmeren (ADP;

AMP) zu, d.h. die Linse kann ihre Stoffwechselleistungen wegen ungenügender Energiebereitstellung wahrscheinlich nicht mehr erfüllen.

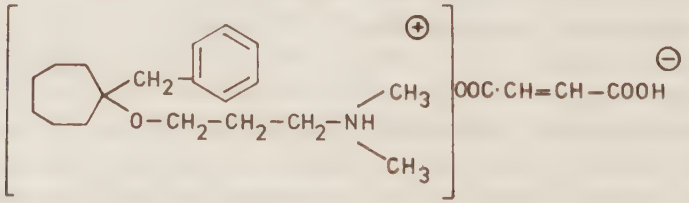
2.6. Fludilat R

Bencyclan (Fludilat R, Dr. Thiemann GmbH), welches den "generic name" Bencyclanhydrogenfumarat trägt, wird als Vasodilatator zur Therapie peripherer und cerebraler Durchblutungsstörungen eingesetzt.

Es liegt in der Form von Dragees mit 5o mg (Fludilat R), mit 15o mg (Fludilat R forte) und als Depotpräparat mit 2oo mg Bencyclanhydrogenfumarat (Fludilat R retard) vor. Zur intravenösen oder intraarteriellen Infusion sind Ampullen zu 5 ml, die 5o mg, und Durchstechampullen (Fludilat R DTI) zu 1o ml, die 25o mg Bencyclanhydrogenfumarat enthalten, im Handel. In einigen Ländern ist Fludilat R unter dem Handelsnamen Halidor R bekannt (Thiemann Arzneimittel, 1976).

2.6.1. Chemische und physikalische Eigenschaften

Bencyclan ist ein Cycloheptyl-Derivat tertiärer Aminoäther und hat die nachstehende Strukturformel:



Bencyclanhydrogenfumarat

N-3-(1-Benzyl-Cycloheptyl-oxy)-propyl N,N
dimethyl-ammonium-hydrogenfumarat
Summenformel: C_{23} H_{35} NO_5
Molekulargewicht: 4o5,54 Fumarat-Anteil: 115
Gruppe: Cycloaminoäther

Bencyclan ist eine weiße, geruchslose, kleinnadelförmige Kristalle bildende Substanz. Sie hat einen Basengehalt von 71,3 %. Der pH liegt zwischen 3,5 und 4,5 . Der Schmelzpunkt dieser Substanz liegt bei 13o bis 131°C.

Bencyclan löst sich in Wasser nur mäßig: zu 1% in heißem Wasser, 2%-ig bei 25°C. In Chloroform, Alkohol und Dimethylformamid geht es schnell in Lösung, in Azeton und Benzol ist es dagegen unlöslich.

2.7. Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Fludilat R

Klinische Erfahrungen von Alant & Horváth (197o) wiesen auf ein gutes Ansprechen der diabetischen Angiopathien nach Bencyclantherapie hin. Nach 14-tägiger i.v.-Bencyclangabe bei Diabetikern stellte Heidrich (1975) eine signifikante Besserung der pathologischen Stoffwechselsituation fest. Gleichzeitig stieg bei diesen Patienten der Seruminsulinspiegel an, während er sich bei Patienten mit normalem Kohlenhydratstoffwechsel nicht änderte. Tierexperimentelle Untersuchungen von Méhes & Varga (197o) zeigten allerdings keine Beeinflussung des Blutzuckerspiegels durch Bencyclan. Es müßte demnach noch aufgeklärt werden, auf welchen Mechanismen diese fragliche antidiabetische Wirkung des Präparats beruht.

Im Gegensatz zu Papaverin erhöht Bencyclan bei einer Durchblutungssteigerung den O_2-Verbrauch der Gewebe nicht (Solti, 197o). Nach Szekeres (197o) steigert sich der Coronardurchfluß in höherem Maße als der myocardiale O_2-Verbrauch. Auf diese Weise erfährt das Verhältnis zwischen O_2-Bedarf und -Angebot des Myocards eine

wesentliche Verbesserung. Mittels der Polarographie stellten Kiss et al. (1972) unter Fludilat ^{R} eine Erhöhung des p O_2 von 84 % fest.

Bei Untersuchungen des corticalen Sauerstoffdrucks an Hunden und Schweinen mit einer Bencyclandosis von 1-3 mg/kg KG fand sich ein Anstieg des p O_2-corticalis 3 Minuten nach der Injektion parallel zur Durchblutungsänderung. Erhöhung der injizierten Dosis von 3 auf 5 mg/kg KG führte nicht zu einer weiteren Steigerung des p O_2-corticalis und der Durchblutung (Gärtner et al., 1975). Die Versuche von Schanzenbächer (1976) führten zu ähnlichen Ergebnissen. Nach Hoyer (197o) verbessert Fludilat ^{R} die cerebrale Sauerstoffausschöpfung von Bastardhunden nach einer Schädigung des Gehirns durch arterielle Hypoxämie. Wirkungen auf andere Stoffwechselparameter,wie etwa die Aufnahme von Glucose ins Gehirn, konnte Hoyer (197o) nicht nachweisen.

Kemper & Tenfelde (1974) wiesen mittels einer fluorimetrischen Methode den Übertritt von Bencyclan in das Gehirngewebe nach, allerdings in einer 1o bis 1oo-fach geringeren Konzentration als im Blut. Die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für den Farbstoffindikator "Evans blue" erhöhte sich nicht.

Die umfangreichsten Untersuchungen über eine Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke und einiger Stoffwechselparameter im Gehirn lieferte Hapke (1973, 1974). Nach verschiedenen Bencyclandosen kam es zu einer Vermehrung des Glucosegehalts im Gehirn, zu einer Erhöhung der Anoxietoleranz und zu einer Zunahme der Gehirndurchblutung. Die Laktatkonzentration blieb bei allen Bencyclankonzentrationen unverändert, während der Pyruvatspiegel nach einer Dosis von 25 mg/kg KG signifikant anstieg. Die Befunde, daß i.v. injizierte Stoffe wie 14 C Glucose und Chinin sich im Gehirn der mit Bencyclan behandelten Tiere schneller und stärker ansammeln als bei den vergleichbaren Kontrolltieren, lassen nach Hapke (1974) die Vermutung zu, daß Bencyclan die Blut-Hirn-Schranke für diese Stoffe erniedrigt und dadurch zu einer Besserung der cerebralen Ernährung führt. Da die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke für

Ca^{2+}-Ionen bestehen bleibt, geht ihre Schutzfunktion offenbar nicht verloren.

Nach Tenfelde (1974) gehen die gefundenen erhöhten Glucosewerte und die erhöhte Anoxietoleranz auf eine Verminderung der Stoffwechselaktivität der Gehirnzellen zurück, bedingt durch die zentrale tranquilisierende Wirkung der Substanz. Hapke (1974) dagegen sieht die Ursache in einer schnelleren und besseren Substratversorgung des Gehirns.

Spaan & Hild (1974) beurteilten die Änderung der Stoffwechselsituation durch Fludilat ^{R} anhand des Laktat/Pyruvat- und des Hydroxybutyrat/Acetat-Quotienten. Die Besserung einer hypoxischen Stoffwechsellage durch medikamentöse Beeinflussung muß an diesem Indikatorsystem sichtbar werden. Bei einer i.v. Fludilat ^{R} -Applikation von 4oo mg änderten sich beide Quotienten im Sinne einer Normalisierung des Metabolismus, was auf eine Aktivierung des Kohlenhydratstoffwechsels zurückgeführt werden könnte. Die von Spaan & Hild (1974) gewonnenen Erkenntnisse lagen aber nur an der Grenze der statistischen Signifikanz.

Die Untersuchungen von Schmidt-Schönbein et al. (1975) über den Einfluß von Bencyclan auf das Fließverhalten von Erythrozyten und Vollblut ergaben, daß es unter Bencyclan zu einer protektiven Wirkung gegenüber der durch Laktatzidose (O_2-Mangelversorgung) ausgelösten Versteifung von Erythrozyten kommt. Der Effekt ist bei einem pH von 6,5 - 7,o besonders deutlich. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, inwieweit sich Verformbarkeit und ATP-Spiegel der Erythrozyten korrelieren lassen.

Mányai (1974) berichtete ebenfalls über einen membranstabilisierenden Effekt von Bencyclan. Das Präparat bewirkt durch Veränderung der Lipidstruktur von Erythrozytenmembranen eine Hemmung der Na^{+} - und K^{+} -aktivierbaren Transport-ATPase, bzw. der K^{+} - aktivierbaren p NPPase Aktivität. Der K^{+} - abhängige Dephosphory-

lierungsprozeß der für den Kationentransport verantwortlichen ATPase wird gehemmt. Daraus folgt eine Blockierung der Na^+ -K^+ - Pumpe und eine dem Konzentrationsgefälle entsprechende Kationenbewegung. Die gesteigerte Membranpermeabilität löste nach Mányai (1974) auch eine gesteigerte Glykolyse aus.

Schlußfolgerungen über eine Kohlenhydratstoffwechselanregung durch Fludilat ^{R} lassen sich aus den hier erwähnten Untersuchungen nicht mit Sicherheit ziehen.

2.8. Fludilat ^{R} in der Ophthalmologie

In Anbetracht dessen, daß Bencyclan eine gefäßerweiternde Wirkung besitzt, ist anzunehmen, daß es auch auf die Gefäße der Retina in ähnlicher Weise wirkt und deren Blutversorgung fördert.

In der Geroophthalmologie geben funktionelle Untersuchungen gewöhnlich über die Änderung der Augen keine isolierten Befunde, sondern eine simultane Erfassung des cerebrovaskulären Systems. Untersucht und bewertet wurden unter anderem die Sehschärfe, die Blickfähigkeit, die gesteuerten Bewegungen des Auges, die Amplitude und die Geschwindigkeit der Irisbewegung und das Augenfundusbild unter Einbeziehung der subjektiven Angaben der Patienten.

Nach Bencyclangabe war eine Besserung der Sehschärfe zu beobachten, die in der Kontrollgruppe fehlte. Durch Besserung der okulokortikalen Funktion kam es zu einer schnelleren und sicheren Erkennung von Farben. Nach Lengyel et al. (197o) und Dinkhoff & Schmidt (1975) bestätigen die Visusverbesserungen und die schnellere Erkennung von Farben die Besserung der Durchblutung von Retina und Kortex. Auch bei Patienten, die über Verschwommen- und Verzerrtsehen und Augenflimmern klagten, wurde in ca. 86 % der Fälle ein Therapieerfolg erzielt.

V. Födö (197o) registrierte mit Hilfe von ophthalmodynamometrischen Untersuchungen nach der Methode von Weigelin (1962) die

Pulsationserscheinungen der A. centralis retinae. Nach gewissen hämodynamischen Gesetzmäßigkeiten lassen sich ziemlich objektive Folgerungen auf das Verhalten der A. ophthalmica und anschließend der A. carotis interna ziehen. Auch seine Patienten zeigten unter Bencyclan-Therapie Visusverbesserungen.

In Kenntnis der muskulotropen Wirkung von Fludilat ^{R} wurden die Funktionen des M. sphincter und dilatator pupillae beobachtet. Bei der Bencyclan-Gruppe ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine entscheidende Verlangsamung der Irisbewegung erkennen (Lengyel et al., 197o; U. Dinkhoff, B. Schmidt, 1975).

Nach Befunden von W. Leydhecker et al.(1974) steigerte Bencyclan den i.o.-Druck nie. Der i.o.-Druck folgt den Blutdruckveränderungen, unabhängig von der Kammerwinkelweite oder der Ausgangshöhe des i.o.-Druckes, meist nicht. Aus diesem Grunde ist eine Verordnung von Fludilat ^{R} auch bei Glaukompatienten unbedenklich.

2.8.1. Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels der Linse durch Fludilat ^{R}

Die Beobachtung der lokalanaesthetischen Wirkung, der Hemmung der Ca^{2+}-Permeabilität der Zellmembran glatter Muskelzellen sowie mikroskopische Untersuchungen über Formveränderungen von Erythrozyten und Thrombozyten ließen vermuten, daß Fludilat ^{R} an Zellmembranen oder Zelloberflächen angreift.

Diese Membran- und Oberflächenwirkung von Fludilat ^{R} und zahlreiche Versuche, in denen es gelungen war, durch Zugabe anderer Substanzen zum Nährmedium oder Homogenat den Linsenstoffwechsel zu beeinflussen, führten dazu, die Wirkungen dieses Präparates auf die Linse zu untersuchen.

Loth (1976) untersuchte den Einfluß von Fludilat ^{R} auf den Gasaustausch von Linsenhomogenaten in der Warburg Apparatur. Ein 1o % Homogenat von Rinderlinsen mit 25 m M/l Glucose als

Substrat zeigte durch Zusatz von $1o^{-2}$ M Fludilat ^{R} eine signifikante Steigerung des O_2-Verbrauches und korrespondierend eine signifikante Erhöhung der CO_2-Bildung. Bei vermehrtem Glucosegehalt im Homogenat **steigerte sich die O_2-Aufnahme und die CO_2-**Bildung noch weiter (Korte et al., 1977 b).

Hockwin et al.(1977) und Hockwin (1977) prüften, ob die gefundene Steigerung des Gasaustausches im Linsenhomogenat auch Auswirkungen auf den Gehalt an ATP hat.

In Gegenwart von $1o^{-2}$ Fludilat ^{R} stabilisiert sich das Verhältnis der Adeninnukleotide zueinander, der Abfall an ATP ist mit 15 % gegenüber dem Ausgangswert ausgesprochen gering, denn während der Inkubation mit 25 m M/l Glucose ohne Fludilat ^{R} sank der ATP-Gehalt auf etwa 1/3 des Ausgangswertes. Dementsprechend scheint Fludilat ^{R} im Homogenat wirksamer als Glucose den Energiehaushalt der Linse zu beeinflussen.

Wurden die Linsenhomogenate zunächst verschieden lange bei 37° C ohne Fludilat ^{R}-Zusatz inkubiert, und später erst Fludilat ^{R} zugesetzt, so zeigte sich nach $1o^{-2}$ M Fludilat ^{R} eine Erhöhung des ATP- und eine Verminderung des AMP-Spiegels, d.h. eine Normalisierung der Verteilung der freien Adeninnukleotide (Hockwin et al., 1977; Hockwin, 1977).

Inkubation von normalen Rinderlinsen in $1o^{-2}$ - $1o^{-6}$ M Fludilat ^{R} -haltiger Nährlösung zeigten keine Verbesserung des Nukleotidstoffwechsels, bei $1o^{-3}$ und $1o^{-2}$ M Bencyclan-Konzentrationen im Nährmedium kam der Linsenstoffwechsel sogar zum Erliegen (Hockwin et al., 1978).

Bei Verarmung der Linse an Substraten für den Energiehaushalt, was durch 4- bzw. 21-stündige Vorinkubation in Krebs-Ringer-Lösung bei 37 ° C erreicht wird, gelang in einer anschließenden 2-stündigen Inkubation mit $1o^{-6}$ - $1o^{-2}$ M Fludilat ^{R} eine Annäherung an die Normalwerte für die ATP/ADP/AMP-Verteilung. Ebenfalls kam es zu einer Verminderung im Laktat-Gehalt und einer Normali-

sierung des Laktat/Pyruvat-Quotienten. Die Wirkung war bei 10^{-2} M Fludilat ^{R} am stärksten ausgeprägt. Die Ergebnisse lassen auf eine Aktivierung der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus schließen (Hockwin et al., 1978).

Korte et al. (1977 a) fanden keinen Unterschied zwischen Na_2-Fumarat und dem Fumarsäurerest des Bencyclan bezüglich der Substrataffinität der Fumarase. Sie bestimmten die Michaelis-Menten-Konstante für Fumarase nach dem Test von Racker und einem kombinierten Test, in welchem die Bildung von NADH bei der Reaktion Fumarat→Malat→Oxalacetat als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit benutzt wurde. Unter Verwendung von Bencyclan bzw. Na_2-Fumarat als Substrat wurde für beide Substanzen ein K_M-Wert von $1{,}3 \times 10^{-3}$ M gefunden. Dieser Befund berechtigt zu der Annahme, daß der Fumarsäurerest des Bencyclanmoleküls als Substrat für den Zitronensäurezyklus Bedeutung haben könnte (Abb.4).

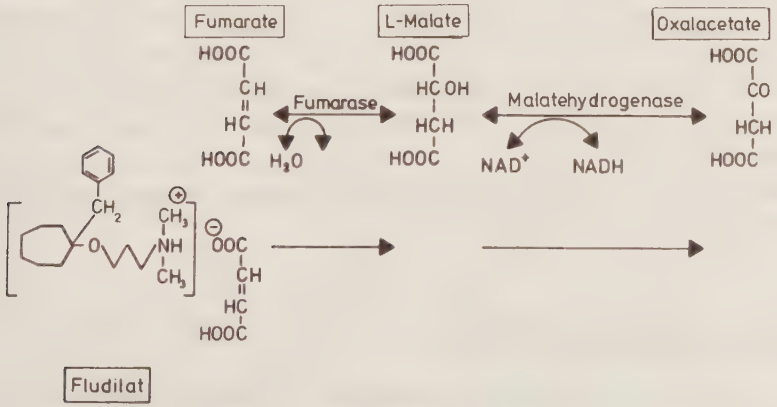


Abb.4 : Darstellung des Enzym-Tests
(Hockwin et al., 1977)

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Lösungen

3.1.1. Kinsey-B-Ringer

Bei 6 Versuchen wurden die Linsenpaare in Kinsey-B-Ringer-Lösung vorinkubiert. Diese setzt sich wie folgt zusammen:

58,oo ml	o,9o %	Na Cl
2,35 ml	1,15 %	K Cl
1,15 ml	1,22 %	$Ca\ Cl_2$
o,6o ml	3,82 %	$Mg\ SO_4$
o,6o ml	2,11 %	$K\ H_2\ PO_4$
12,25 ml	1,3o %	$Na\ H\ CO_3$

Pro Versuchsansatz (6 Paar Rinderlinsen) wurden mindestens 3oo ml Kinsey-B-Ringer-Lösung benötigt, d.h. es wurden insgesamt 145o ml o,9 % Na Cl, 58,75 ml 1,15 % K Cl, 28,75 ml 1,22 % $Ca\ Cl_2$, 15 ml 3,82 % $Mg\ SO_4$, 15 ml 2,11 % $K\ H_2\ PO_4$ und 3o6,25 ml 1,3o % $Na\ H\ CO_3$ (= 1873,75 ml Kinsey-B-Ringer-Lösung) angesetzt. Die Lösungen wurden aus den einzelnen Reagenzien und Aqua bidest. hergestellt. Die 1,3 % $Na\ H\ CO_3$ - Lösung durfte erst kurz vor jedem Versuch zu den anderen Lösungen gegeben werden, da sonst $Ca\ CO_3$ ausfallen würde.

3.1.2. Inkubationslösungen

Vor jedem Versuch wurden die Inkubationslösungen frisch angesetzt.

TC Medium 199

Morgan & Morton Medium 15o Code 57o1

Substanzmengen pro Liter

L-Arginin	7o mg	Kalzium Pantothenat	o,o1 mg
L-Histidin	2o mg	Biotin	o,o1 mg
L-Lysin	7o mg	Folsäure	o,o1 mg
L-Tyrosin	4o mg	Cholin	o,5 mg
DL-Tryptophan	2o mg	Inositol	o,o5 mg
DL-Phenylalanin	5o mg	p-Aminobenzoesäure	o,o5 mg
L-Cystin	2o mg	Vitamin A	o,1 mg
DL-Methionin	3o mg	Calciferol	o,1 mg
DL-Serin	5o mg	Menadion	o,o1 mg
DL-Threonin	6o mg	α-Tocopherolphosphat	o,o1 mg
DL-Leucin	12o mg	Ascorbinsäure	o,o5 mg
DL-Isoleucin	4o mg	Glutathion	o,o5 mg
DL-Valin	5o mg	Cholesterol	o,2 mg
DL-Glutaminsäure	15o mg	L-Glutamin	1oo mg
DL-Asparaginsäure	6o mg	Adenosintriphosphat	1 mg
DL-Alanin	5o mg	Adenylsäure	o,2 mg
L-Prolin	4o mg	Ribose	o,5 mg
L-Hydroxyprolin	1o mg	Desoxyribose	o,5 mg
Glycin	5o mg	Bacto-Dextrose	1 g
L-Cystin	o,1 mg	Tween 8o	5 mg
Adenin	1o mg	Natriumacetat	5o mg
Guanin	o,3 mg	Eisen (als Eisennitrat)	o,1 mg
Xanthin	o,3 mg	Natriumchlorid	8 g
Hypoxanthin	o,3 mg	Kaliumchlorid	o,4 g
Thymin	o,3 mg	Kalziumchlorid	o,14 g
Uracil	o,3 mg	Magnesiumsulfat	o,2 g
Thiamin Hydrochlorid	o,o1 mg	Dinatriumphosphat	o,o6 g
Riboflavin	o,o1 mg	Monokaliumphosphat	o,o6 g
Pyridoxin Hydrochlorid	o,o25 mg	Natriumbicarbonat	o,35 g
Pyridoxal Hydrochlorid	o,o25 mg	Bacto-Pehol rot	o,o2 g
Niacin	o,o25 mg	Kohlendioxyd bis pH 7,2	
Niacinamid	o,o25 mg	Reines Wasser	1ooo ml

3.1.2.1. TC 199-Inkubationslösung

5,5 g TC Medium 199 (Dried, Difco, Code 57o1) wurden auf der Mettlerwaage (Typ P 12o) abgewogen und mit ungefähr 4oo ml Aqua bidest. in einem 5oo ml-Meßkolben aufgelöst. Dann wurden 175 mg Na H CO_3 (Substanzen, die in der Größenordnung von mg verwendet wurden, wurden auf der Mettlerwaage HZOT gewogen) hinzugegeben und auf 5oo ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Da das TC-Medium den Farbstoffindikator Bacto-Phenolrot (Umschlagsbereich bei pH 6,8 - 8,o von gelb nach rot) enthält, nahm die Lösung nach Zugabe von Natriumhydrogencarbonat eine rötliche Farbe an. Die Lösung wurde in eine Gaswaschflasche umgefüllt und eine halbe Stunde lang mit Luft durchperlt.

Auf Grund der eintretenden Reaktion:

$$2\ Na\ H\ CO_3 \rightleftharpoons \downarrow CO_2 + H_2O + Na_2\ CO_3$$

stabilisiert sich der pH. Ferner wird auf diese Weise gewährleistet, daß die Linse während der Inkubation von einem genügend großen O_2 - Partialdruck umgeben wird (siehe 2.5.) .

In dieser Lösung wurden alle Kontrollinsen inkubiert.

3.1.2.2. Fludilat ^{R} - Inkubationslösung

Ausgangslösung: Zu 2,o3 g Bencyclanhydrogenfumarat (Fludilat ^{R}, Mg 4o5,54) wurde in einem 5o ml-Meßzylinder ungefähr 3o-4o ml der oben beschriebenen TC 199-Inkubationslösung hinzugegeben. Fludilat ^{R} ging jedesmal schlecht in Lösung. Auf Grund des Fumarsäureanteils sank der pH unter 6,8 und es mußte bis zum Umschlag nach rot mit einigen Tropfen KOH nachtitriert werden. Danach wurde mit der TC 199-Inkubationslösung bis 5o ml aufgefüllt, so daß eine 1oo mM Ausgangslösung entstand. Zum Herstellen einer 1o mM und einer 5o mM Fludilat ^{R} -Lösung wurden 2o3,o mg

bzw. 1,o15 g in einer 5o ml TC 199-Lösung gelöst.

Inkubationslösung: In die Hälfte der Inkubationsschälchen (für die Versuchslinsen) wurden 2,5 ml der 1oo, 5o oder 1o mM - Fludilat ^{R} -Lösung zu 22,5 ml TC 199-Inkubationslösung pipettiert, so daß die Inkubationsgefäße 25 ml einer 1o mM bzw. 5 oder 1 mM Fludilat ^{R} -Nährlösung enthielten.

3.1.2.3. Di-Natrium-Fumarat-Inkubationslösung

Ausgangslösung war eine 1oo mM Di-Natrium-Fumarat-Lösung. Dazu wurden 8oo mg Na_2-Fumarat (Di-Natriumsalz, Summenformel: $C_4\ O_4\ H_2$ - Na_2 , Mg: 16o,o) in 5o ml der TC 199-Inkubationslösung gelöst. In den Inkubationsschälchen wurden 2,5 ml dieser Lösung wieder mit 22,5 ml TC 199-Inkubationslösung zu einer 1o mM Na_2 - Fumarat - Nährlösung verdünnt.

3.1.3. Hydrazinpuffer

1,6 ml einer 24 % Hydrazinhydroxidlösung ($N_2\ H_5\ OH$) wurden im 5o ml-Meßzylinder mit ca. 25 ml Aqua bidest. verdünnt. Mit ungefähr 4 ml einer o,1 N Salzsäure wurde ein pH von 9 eingestellt (Kontrolle mit pH-Papier). Dann wurde mit Aqua bidest. bis 5o ml aufgefüllt, so daß der Puffer eine Molarität von 1,5 hatte. Dieser Puffer wurde vor jeder Bestimmung der Malatkonzentration frisch angesetzt.

3.2. Tiermaterial, Beschaffung und Präparation

Als Ausgangsmaterial für alle Versuche dienten Augen von Kälbern und Rindern, die auf dem städtischen Schlachthof von Bonn geschlachtet wurden. Die Augen wurden gleich nach dem Tode entnommen, paarweise in ein gemeinsames Mullsäckchen gepackt und in einem zur Hälfte mit Eiswürfeln gefüllten Dewargefäß ins Labor transportiert.

Die Präparation der Linsen erfolgte 1/2 bis 1 1/2 Std. nach dem Tode der Tiere. Dabei wurde durch einen Hornhautschnitt mit einer Rasierklinge am Limbus cornea die Vorderkammer geöffnet und die ganze Cornea mit einer Schere in zirkulärer Schnittführung eng am Limbus abgeschnitten. Die Iris wurde mit einer gebogenen anatomischen Pinzette gefaßt und rundherum an ihrer Basis im ganzen abgezogen. Dann wurde auf den Bulbus ein allseitiger Druck ausgeübt, um die freiliegenden Zonulafasern zu spannen, die mit einem Daviel-Spatel, ohne die Linse zu verletzen, durchtrennt wurden. Nun wurde die Linse vorsichtig mit der gebogenen anatomischen Pinzette durch Daruntergreifen herausgehoben. Es konnten für die Versuche nur unversehrte Linsen benutzt werden, da eine Inkubation der Linsen nur dann auswertbare Ergebnisse liefert, wenn die Linsenkapsel intakt ist. Darauf folgte die Säuberung von Zonulafasern und Glaskörperresten. Ebenso wurde gleich anschliessend der Paarling behandelt.

Direkt nach der Präparation wurden die Linsen auf der Mettlerwaage (Typ P 12o) gewogen. Das Linsengewicht schwankte zwischen den beiden extremen Werten von 1,8 und 2,8 g, was einem Alter von 1 Jahr bis 17 Jahren entspricht (Schmutter, 1961).

3.3. α-Ketoglutarat-Vorversuche

Bevor die Versuche mit dem Bencyclanhydrogenfumarat durchgeführt wurden, wurde die Versuchsmethode mit Hilfe von α-Ketoglutarat

standardisiert. Es wurden Konzentrationen, pH und Menge der zu verwendenden Lösungen variiert, bis geeignete Testbedingungen für die Versuchsdurchführung gefunden worden waren.

Gebraucht wurde α-Kteoglutarat als Di-Natriumsalz mit der Summenformel $C_5\ H_5\ O_5\ Na_2$ und einem MG von 19o,1.

Mit α-Ketoglutarat wurde der Linse während der Inkubation ein später zu messendes Intermediärprodukt des Zitronensäurezyklus direkt angeboten. Es zeigte sich, daß α-Ketoglutarat die Linsenkapsel zu durchdringen vermag und im Vergleich zu den Kontrolllinsen eine deutliche Zunahme dieser Substanz in der Linse festzustellen war. Eine Erhöhung der α-Ketoglutaratkonzentrationen in den Versuchslinsen wurde mit einer 1mM α-Ketoglutarat-Inkubationslösung erzielt (Herstellung wie bei 3.1.2.2. oder 3.1.2.3.) . Bei diesen Vorversuchen wurde der L-Malat-Gehalt des Extraktes nicht gemessen.

Im Folgenden wird der durch die α-Ketoglutarat-Vorversuche erhaltene Versuchsablauf näher beschrieben.

3.4. Versuchsablauf

3.4.1. Inkubation

Jeder Versuch wurde mit 6 Paar Rinderlinsen durchgeführt.

Nachdem ein Linsenpaar gewogen worden war, wurde der eine Paarling in eine vorher sterilisierte Glasdose mit Deckel mit 25 ml der unter 3.1.2.1 beschriebenen TC 199-Inkubationslösung gelegt (Kontrollinse, Probe). Die andere Linse kam in ein Inkubationsgefäß, in welchem 25 ml der 1 mM bzw. 5 oder 1o mM Fludilat ^{R} - oder der 1o mM Na_2-Fumarat-Inkubationslösung als Nährmedium dienten (behandelte Linse, Versuchslinse).

Die Linsenpaare wurden in den Glasdosen grundsätzlich auf den hinteren Pol gelegt, da dieser auch unter in-vivo-Bedingungen durch die Nachbarschaft zum Glaskörper schlechter ernährt wird.

Die Inkubationsschälchen wurden sogleich in den Brutschrank gebracht und die Linsen dort für 3 Stunden in den entsprechenden Kultivierungsflüssigkeiten bei 37° C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Nährmedien der Kontroll- und Versuchslinsen jeweils in einem 15o ml Becherglas gesammelt. Der pH wurde nach Abkühlen der Inkubationslösungen auf 21-23°C mit einem Digital pH-Meter (Typ PHM 52) mit einer Meßgenauigkeit von pH ≈ o,oo5 gemessen. Für die TC 199-Inkubationslösung lag der pH durchschnittlich bei 7,76, für die 1o mM Fludilat ^{R}-Nährlösung bei 7,7o und für die 1o mM Na_2-Fumaratlösung bei 7,66. Beim Messen mit pH-Papier, das den Indikator Methylorange enthielt und einen Meßbereich zwischen pH 6-8 anzeigte, wurde immer ein zu niedriger Wert angegeben.

Bei 6 Versuchen wurde dieser Inkubation eine Kultivierung mit Kinsey-B-Ringer-Lösung vorgeschaltet. Kontroll- und Versuchslinsen wurden 4 Stunden bei 37° C in 25 ml der Kinsey-B-Ringer-Lösung inkubiert, dann mit Aqua bidest. abgespritzt, auf Filterpapier getrocknet und auf der Mettlerwaage gewogen. Danach wurden die Kontrollinsen in die 25 ml TC 199-Inkubationslösung und die Versuchslinsen in die Fludilat ^{R}- oder in die Na_2-Fumarat-Nährlösung gelegt.

3.4.2. Herstellung des Linsenextraktes

Während der Inkubationszeit wurden die ml o,6 N H Cl O_4 (51,6 ml 7o % H Cl O_4 ad 1ooo ml Aqua bidest.) berechnet, die beim Homogenisieren zum Enteiweißen benötigt wurden. Bei allen Versuchen wurde jeweils das Siebenfache des Linsenfrischgewichtes in die Homogenisierungsröhrchen pipettiert, so daß 1g Linsenfrischgewicht mit 7 ml o,6 N Perchlorsäure verdünnt wurde. Bis zum Ende

der Inkubation wurde das Reck mit den Homogenisierröhrchen in den Kühlschrank gestellt.

Nach 3 Std. Inkubation bei 37° C wurden die Inkubationsgefäße paarweise dem Brutschrank entnommen. Bei der weiteren Verarbeitung der Linsen wurden Kontroll- und Versuchslinsen nicht unterschiedlich behandelt.

Die Linsen wurden mit einer gebogenen anatomischen Pinzette für 3 Minuten in Schälchen mit eiskaltem Aqua bidest. gelegt, um die chemischen Reaktionen zu stoppen. Anschließend wurden die Linsen mit eiskaltem Aqua bidest. abgespritzt, auf Filterpapier vorsichtig getrocknet, bei erfolgter Vorinkubation nochmals gewogen und in die vorbereiteten Homogenisierröhrchen mit o,6 N $H Cl O_4$ gelegt.

Zur Fällung des Eiweißes wurden die Linsen in den jeweils errechneten ml o,6 N $H Cl O_4$ mit dem Messerhomogenisator Ultra Turrax (Typ 1812) bei 2o ooo Umdrehungen/Min. homogenisiert; der Extrakt nahm eine milchige Farbe an.

Nachdem dieser 1o Min. im Kühlschrank gestanden hatte, wurde der gesamte Extrakt eines Homogenisierröhrchens auf 2 Zentrifugenröhrchen mit gleicher Numerierung verteilt. Um eine Unwucht zu vermeiden, wurden jeweils diese beiden Zentrifugenröhrchen mit einer Tarierwaage äquilibriert und gegenüberliegend in den Rotor gestellt. Es wurde 2o Min. bei 15 ooo Umdrehungen/Min. in der MSE zentrifugiert.

Inzwischen wurden die 12 Reagenzgläser, die Glasfilter und das Filterpapier bereitgestellt. Die Rundfilter wurden in Trichterform gefaltet.

Der Extrakt zweier gleichnumerierter Zentrifugenröhrchen wurde in ein Reagenzglas dekantiert, wobei das Eiweiß in den Zentrifugenröhrchen als weißer Rückstand blieb.

Vom Dekantat wurden jeweils 7 ml in ein anderes Reagenzglas pipettiert und diese mit einem Metallständer in ein Eisbad gestellt. Um bei den Extrakten einen pH-Wert zwischen 7,o und 7,5 zu erhalten, wurden dazu 1,4 ml eines eiskalten 1,75 M $K_3 PO_4$ (MG 266,32) -Puffers pipettiert. Dabei wurde der Extrakt etwas trübe und nach wiederholtem Schütteln im Eisbad setzte sich ein weißer Niederschlag von K Cl O_4 am Boden des Reagenzglases ab.

Nach 15 Min. Eisbad wurde der Extrakt erneut durch Filterpapier dekantiert. Waren einige so gewonnene Extrakte noch etwas trüb, wurden sie nochmals durch Filterpapier filtriert.

Als letztes wurde von diesen Extrakten der pH gemessen. Bei der pH-Messung mittels Elektrode ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 7,19 , mittels pH-Papier (Bereich: pH 6-8) von 7,o für alle Extrakte. Danach wurden sie bis zum nächsten Tag für die Bestimmung der Metabolitenkonzentration in den Kühlschrank gestellt.

3.5. Enzymatische Bestimmung von Metaboliten (Endwertmethode) (Bergmeyer, 1974)

Grundlage der erstmalig von O.Warburg entwickelten enzymatischen Analyse ist eine chemische Veränderung eines an der spezifischen enzymatischen Reaktion beteiligten Pyridinnukleotids, wodurch es zu einer charakteristischen meßbaren Änderung der Lichtabsorption kommt. Die Pyridincoenzyme zeigen Lichtabsorption bei 26o nm, im reduzierten Zustand zusätzliche Absorption zwischen 3oo und 4oo nm. An der Extinktion E bei 34o oder 366 nm läßt sich die enzymatische Umsetzung des Substrates S_1 bzw. S_2 in der Photometerküvette ohne Eingriff in das chemische Geschehen direkt verfolgen.

Es gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$(1) \qquad E = \log \frac{I_o}{I} = \varepsilon \times c \times d$$

I_o = Intensität des einstrahlenden Lichtes
I = Lichtintensität nach Durchgang durch die Meßlösung
ε = Extinktionskoeffizient der Meßsubstanz für die gemessene Wellenlänge (z.B. NADH, NAD)
c = Konzentration des lichtabsorbierenden Stoffes
d = Schichtdicke der Meßküvette (cm).

Es ist gleichgültig, ob NAD Substratwasserstoff aufnimmt oder ob NADH Wasserstoff abgibt, denn Meßgröße ist allein die Extinktionsdifferenz ΔE.

Allgemein in einer Formel:

$$(2) \qquad S_1 + \text{Coenzym}^+ \xrightarrow{E_1} P_1 + \text{Coenzym-H} + H^+$$

$$(3) \qquad S_2 + \text{Coenzym-H} + H^+ \xrightarrow{E_2} P_2 + \text{Coenzym}^+$$

$S_{1,2}$ = Substrat
$P_{1,2}$ = Produkt
$E_{1,2}$ = Enzym

In der Reaktionsgleichung 2 findet bei der Substratumsetzung durch das Enzym E_1 eine Extinktionszunahme (Konzentrationszunahme an Coenzym-H), bei der Substratumsetzung S_2 eine Extinktionsabnahme statt.

Alle enzymatischen Reaktionen mit Coenzymen sind 2-Substrat-Reaktionen. Zwei-Substratreaktionen lassen sich aber reaktionskinetisch wie Ein-Substratreaktionen behandeln, wenn eines der Substrate relativ zu seiner Michaelis-Menten-Konstante in sehr

großer Konzentration vorliegt. Auch für die Endwertbestimmung mit Coenzymen wird man diese Bedingungen anstreben, schon allein wegen der erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit. Ist NAD(P)H zweites Substrat, setzt dessen Extinktion der Konzentrationserhöhung Grenzen.

Der besondere Wert der enzymatischen Analyse liegt darin, daß Enzyme auf Grund ihrer hohen Spezifität aus einem Stoffgemisch, welches eine Vielzahl chemisch ähnlicher Komponenten enthält, eine Substanz spezifisch und quantitativ erfassen. Im folgenden wurden nach dieser Methode 2 Substrate des Zitronensäurezyklus bestimmt: α-Ketoglutarat und L-Malat.

3.5.1. α-Ketoglutaratbestimmung
(Wallenfels & Christian, 1974)

Die enzymatische Bestimmung von α-Ketoglutarsäure mit reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) und Glutamatdehydrogenase (GLDH) wurde von Wallenfeld & Christian ausgearbeitet, nachdem das Enzym rein isoliert und kristallisiert werden konnte. Zum Nachweis der α-Ketoglutarsäure konnte man sich weitgehend an die Angaben von Bergmeyer (1974) halten, mußte aber meist geringer konzentrierte Lösungen verwenden, da sich alle Angaben auf Gewebe und Vollblut bezogen, in denen bekanntlich die nachzuweisenden Substanzen in einer höheren Konzentration vorliegen.

Die Extrakte wurden aus dem Kühlschrank geholt und solange stehen gelassen, bis sie sich auf 25° C erwärmt hatten. Das Spektrallinienphotometer (Typ 4 Q III 61o38, Anzeigegerät: PM Q II 6o248) wurde 1/4 Stunde vor Beginn der Messung auf 34o nm eingestellt und die Quecksilberlampe eingeschaltet.

Herstellung der NADH-Lösung: Verwendet wurde β-NADH-Na_2 (Summenformel: $C_{21}\ H_{27}\ N_7\ O_{14}\ P_2$-$Na_2$, MG 7o9,4). Es wurden 2,5 mg β-NADH -Na_2 **in 1 ml 1% Na-Bicarbonatlösung gelöst.**

Herstellung der GLDH-Lösung: Die GLDH wurde aus Rinderleber extrahiert und 2o mg GLDH waren in 1 ml 2,o M Ammoniumsulfatlösung mit einem pH von ca. 7 gelöst. Die Kristallsuspension wurde mit einer 2,o M Ammoniumsulfatlösung nochmals so verdünnt, daß eine Endkonzentration von 4 mg/ml entstand.

Leerwert: Zu 4 ml Aqua bidest. wurden o,3 ml o,o1 % Kaliumdichromatlösung pipettiert.

Nacheinander wurden in eine 2 cm Küvette pipettiert:

4,oo	ml	Linsenextrakt	
o,o5	ml	NADH	(2,5 mg/ml)

Danach wurde mit einem kleinen Rührstäbchen beides gut durchgemischt und die Extinktion zur Zeit t=O abgelesen. Dann wurden

o,o2	ml	GLDH	(4 mg/ml)

hinzugegeben und nochmals des ganze Küvettenvolumen gemischt. Es wurden die Extinktionen bei 3', 5', 8', 12' und 15 Minuten notiert. Nach 15 Minuten war keine Abnahme der NADH-Extinktion mehr festzustellen, d.h. die Reaktion war abgelaufen und das ganze Substrat umgesetzt.

Die Reaktion verlief nach der Gleichung:

$$(4) \quad \alpha\text{-KG} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+ \xleftarrow{+\ \text{GLDH}} \text{Glutamat} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$$

Bei Überschuß an NH_4^+-Ionen und NADH wird α-Ketoglutarat innerhalb von 1o Minuten bei einem pH von 7,5 quantitativ in Glutamat überführt. Unter diesen Bedingungen verläuft die Reaktion stöchiometrisch, d.h. pro Mol α-Ketoglutarat wird 1 Mol NADH oxydiert, d.h. die Extinktionsabnahme (ΔE) ist der Konzentrationsabnahme von α-Ketoglutarat proportional. Man kann daher die Menge α-Ketoglutarat, die bei der Reaktion umgesetzt wurde, nach der Formel berechnen:

$$(5)\quad \frac{\Delta E \times GKV \times GV \times 100}{d \times \varepsilon_o \times EV \times LFG} = \frac{\mu Mol}{100\ g\ LFG}$$

ΔE = gemessene Extinktionsdifferenz (zwischen t=0 und t=15 Minuten)
GKV = Gesamtvolumen in der Küvette (ml)
GV = Endvolumen des Linsenansatzes (ml)
d = Schichtdicke der Küvette (cm)
ε_o = mikromolarer Extinktionskoeffizient (cm^2/Mol) bei gemessener Wellenlänge
EV = Eigenes Volumen in der Küvette (ml)
LFG = Linsenfrischgewicht (g)

Da jedesmal 1 g Linsenfrischgewicht in 7 ml o,6 N $HClO_4$ + 1,4 ml 1,75 M K_3PO_4 (= 8,4 ml) verdünnt ist, geht das Linsengewicht in das Endvolumen des Linsenansatzes mit ein und es ergibt sich:

$$(6)\quad \frac{\Delta E \times GKV \times GV \times 100}{d \times \varepsilon_o \times EV} = \frac{\mu Mol}{100\ g\ LFG}$$

Der mikromolare Extinktionskoeffizient von NADH bei 34o nm ist 6,2 . Setzt man nun auch die anderen Werte in die Gleichung ein, so lautet diese:

$$(7)\quad \frac{\Delta E \times 4{,}07 \times 8{,}4 \times 100}{2 \times 6{,}2 \times 4{,}0} = \Delta E \times 68{,}93$$

$= \mu Mol\ \alpha KG\ /\ 100\ g\ LFG$

3.5.2. L-Malat-Bestimmung

(Gutmann & Wahlefeld, 1974)

Die enzymatische Bestimmung von L-Malat erfolgte nach der α-Ketoglutarat-Bestimmung. Da der Extrakt in der 1 cm Küvette stark verdünnt wurde, wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm gemessen. Die spezifische Absorption von NADH bei 366 nm ist zwar nur noch

halb so groß wie bei 34o nm, Konzentrationsveränderungen dieser Substanz haben jedoch bei dieser Wellenlänge eine größere Extinktionsänderung zur Folge.

Herstellung der NAD-Lösung: Verwendet wurde ß-NAD mit der Summenformel: $C_{21}\ H_{27}\ N_7\ O_{14}\ P_2$, das MG beträgt 633,4. 3o mg ß-NAD wurden in 2 ml Aqua bidest. gelöst.

Herstellung der MDH-Lösung: Das MDH-Enzym wurde aus Mitochondrien eines Schweineherzens gewonnen. 5 mg der Suspension waren in 1 ml einer 3,2 M Ammoniumsulfatlösung gelöst. Für diesen Test wurde 1 ml dieser Suspension nochmals mit 4 ml Aqua bidest. verdünnt.

In eine 1 cm Küvette wurden nacheinander pipettiert:

2,oo	ml	Hydrazinpuffer	1,75 M pH = 9
o,69	ml	Aqua bidest.	
o,o1	ml	MDH	(1 mg/ml)
o,1	ml	NAD	(15 mg/ml)
o,2	ml	Linsenextrakt	

Nach Zugabe des Linsenextraktes wurde der gesamte Küvettenansatz gut durchmischt und sofort die Extinktion E_o abgelesen. Gemessen wurde gegen Luft (Leerwert) bei 366 nm nach 3', 5', 9', 12' und 15 Minuten. Schon nach 12 Minuten fand meist keine Extinktionszunahme mehr statt, d.h. die Reaktion in der Küvette war abgelaufen und NAD bzw. L-Malat verbraucht. In der Küvette lief folgende Reaktion ab:

$$(8)\quad \text{L-Malat} + NAD^+ + \text{Hydrazin} \xrightarrow[pH\ =9]{MDH} \text{Oxalacetathydrazon} + NADH + H^+$$

Nach Gutmann & Wahlefeld (1974) liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite von Malat und NAD . Die Gleichgewichtskonstante beträgt bei 25° C $K = 5{,}o - 1o^{-13}$ M/l. Unter diesen Versuchsbedingungen wird aber eine quantitative Dehydrierung von L-Malat erreicht, da sowohl alkalisches Milieu als auch das Hy-

drazin durch ihren Sog das Gleichgewicht zugunsten des Oxalacetats verschieben. Durch das alkalische Milieu werden die Protonen, durch das Hydrazin das Oxalacetat abgefangen. Zusätzlich verschiebt eine hohe Konzentration von NAD das Gleichgewicht nach rechts. Ferner ist für eine hinreichend schnelle Reaktion eine hohe MDH-Konzentration notwendig. Unter den hier angegebenen Bedingungen verläuft die Reaktion also stöchiometrisch. Man kann demnach die Menge L-Malat, die während der Reaktion umgesetzt wurde, nach der Gleichung (6) berechnen. Der mikromolare Extinktionskoeffizient von NAD bei 366 nm ist 3,3 , das Gesamtvolumen der Küvette 3 ml, und der Linsenansatz beträgt o,2 ml. Somit ergibt sich:

$$(9)\quad \frac{\Delta E \times 3 \times 8{,}4 \times 100}{1 \times 3{,}3 \times 0{,}2} = \Delta E \times 3818{,}18$$

$$= \mu \text{ Mol L-Malat/ 100 g LFG}$$

3.6. Statistische Auswertung und Ergebnisse

3.6.1. Statistische Verfahren

3.6.1.1. t -Test

(Clauß & Ebner, 1975)

Es wurden Versuchsreihen mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Fludilat ^{R} und Na_2-Fumarat zum Nährmedium durchgeführt, um festzustellen, ob überhaupt ein Effekt im Vergleich zu den Kontrollinsen bei den α-Ketoglutarat- bzw. L-Malat-Konzentrationen erzielt wurde.

Es wurden die nach der Formel (6) berechneten μMol/100 g LFG an α-Ketoglutarat bzw. L-Malat einer statistischen Prüfung unterzogen, ob zwischen den Mittelwerten der behandelten und

der Kontrollinse signifikante Unterschiede bestehen.

Die Mittelwerte der beiden Stichproben sind dann signifikant unterschiedlich, wenn die Nullhypothese verworfen werden kann.

Nullhypothese: $H_o : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$

Alternativhypothese: $H_1 : \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$

Die Prüfung der Nullhypothese wird mit Hilfe des t-Testes durchgeführt. Diesem Test liegt folgende Formel zugrunde:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S \text{ diff}} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$S^2 \text{ diff} = \frac{(n_1 - 1)\ S_1^2 + (n_2 - 1)\ S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

n : Anzahl der Meßwerte

$\bar{x}$: Mittelwerte der Meßwerte

S^2 : Varianz $\quad S^2 = \frac{1}{n-1} \left(\sum x^2 - \frac{1}{n} \left(\sum x_i \right)^2 \right)$

Der errechnete t-Wert wird unter Berücksichtigung der Anzahl der Freiheitsgrade $(n_1 + n_2 - 2)$ in einer Tabelle, Signifikanzschranken der Studentenverteilung, aufgesucht (Sachs, 1969). Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese verworfen werden kann.

Bei der Entscheidung über die Gültigkeit der Hypothese wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p = o,o5 akzeptiert.

3.6.1.2. Regression
(Clauß & Ebner, 1975)

Welche mathematische Beziehung besteht zwischen der Wirkung des Bencyclan auf die Linse und ihren Altersveränderungen?
Dieses Problem kann mit Hilfe der Regression graphisch und mathematisch erfaßt werden. Die Regressionsgerade stellt eine lineare Beziehung zwischen den Variablen dar, wobei x (Alter) als unabhängige und y (gemessene Metabolitenkonzentration) als abhängige Variable anzusehen ist.

Analog zur allgemeinen Geradengleichung gilt:

$$y = b_{yx}\, x + a$$

Aus der nach der Methode der kleinsten Quadrate (Gaußsches Prinzip) abgeleiteten Formel läßt sich die Regressionsgleichung bestimmen:

$$b_{xy} = \frac{\sum(x - \bar{x})\,(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{1}{n}\sum x \sum y}{\sum x^2 - \frac{1}{n}\,(\sum x)^2}$$

b_{yx} ist der Regressionskoeffizient für die Regression von y auf x. Der Zähler enthält die Summe der Produkte der Abstände aller Meßwerte von ihrem zugehörigen Mittelwert; im Nenner befindet sich die Summe der Abweichungsquadrate für $\bar{x}$ (Mittelwert für alle x). Geometrisch gesehen entspricht b dem tan des Steigungswinkels der Regressionsgeraden.

Da die Regressionsgerade durch $\bar{x}$ und $\bar{y}$ verläuft, läßt sich a berechnen nach:

$$\bar{y} - b_{yx}\,\bar{x} = a$$

a gibt den Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse an. Durch diese Parameter ist die Regressionsgerade hinreichend festgelegt.

Ein Maß für die Güte der Abhängigkeit der Metabolitenkonzentra-

tionen (y) vom Linsenalter (x) unter und ohne Fludilat ^{R} - Einwirkung ist das Bestimmtheitsmaß oder der Determinationskoeffizient r^2.

$$r^2 = \frac{\left(\sum xy - \frac{1}{n} \sum x \sum y\right)^2}{\left(\sum x^2 - \frac{1}{n}\left(\sum x\right)^2\right)\left(\sum y^2 - \frac{1}{n}\left(\sum y\right)^2\right)} = b_{yx}\, b_{xy}$$

Der Determinationskoeffizient gibt an, in welchem Ausmaß die Varianz der einen Variablen durch die Varianz der anderen bestimmt wird. Die Anpassung an die Regressionsgerade ist exakt bei $r^2 = 1$ ($\triangleq$ 1oo %).

3.6.2. Ergebnisse der Linsenfrischgewichtsänderungen nach Vorinkubation

Bei Versuchen ohne Vorinkubation wurde lediglich das Frischgewicht der Linsen (LFG) ermittelt.

Bei insgesamt 6 Versuchsabläufen wurde eine 4-stündige Inkubation in Kinsey-B-Ringer-Lösung bei 37° C vorgeschaltet. Die Zunahme des Linsenfrischgewichtes, hauptsächlich durch Wasseraufnahme bedingt, betrug durchschnittlich sowohl für alle Kontroll- als auch Versuchslinsen o,o4 g.

$$\overline{\Delta lg} = \frac{LFG - Lg_I}{n}$$

$\overline{\Delta lg}$ = Mittelwert der Differenz der Linsengewichte
Lg_I = Linsengewicht (g) nach der jeweiligen Inkubation
n = Anzahl der Linsen

Nach Kultivierung in $1o^{-2}$ M Fludilat ^{R} - bzw. Na_2-Fumaratlösung oder TC-199-Inkubationslösung für 3 Std. bei 37° C wurden alle Linsen nochmals gewogen. Für alle Kontrollinsen, die nach der Vorinkubation nur in dem TC-Medium kultiviert wurden, wurde eine durchschnittliche Zunahme des Linsenfrischgewichtes um o,o7 g

gemessen.

Die Linsen, die in einer $1o^{-2}$ M Na_2-Fumarat-Lösung inkubiert wurden, unterschieden sich in ihrer Gewichtsveränderung nicht von den Kontrollinsen.

Anders lagen die Verhältnisse für Linsen, die mit $1o^{-2}$ M Fludilat ^{R}-Lösung behandelt worden waren. Ihre Linsenfrischgewichte erhöhten sich nach Kultivierung um o,17 g, was eine Zunahme von 142 % im Vergleich zu den Kontrollinsen bedeutet.

Auch im makroskopischen Aussehen unterschieden sich diese Linsen von den Kontrollinsen und den mit $1o^{-2}$ M Na_2-Fumarat behandelten. Sie zeigten eine rosa Färbung, während die übrigen außer einer leichten Trübung ihre Durchsichtigkeit behielten.

Die große Gewichtsveränderung und die Änderung des makroskopischen Aussehens der Linsen nach Fludilat ^{R}-Einwirkung lassen vermuten, daß die Linsenkapsel für diese Substanz bzw. ihren Fumarsäureanteil permeabel ist.

3.6.3. Ergebnisse der enzymatischen Analyse

Einige Versuche mit Linsenpaaren, von denen der eine Paarling zum TC-199-Medium eine geringere Konzentration als $1o^{-2}$ M Bencyclanhydrogenfumarat erhielt, wurden keiner statistischen Auswertung unterzogen. Auch wurde bei ihnen nur die α-Ketoglutaratbestimmung durchgeführt.

8 Linsen wurden in einer 1 mM Fludilat ^{R}-Inkubationslösung kultiviert. Im Vergleich zu den Kontrollinsen wurde aber insgesamt eine Abnahme im Metabolitengehalt von -o,78 Mol/1oo g LFG verzeichnet. Auch bei Inkubation von 6 Versuchslinsen in einer 5 mM Fludilat ^{R}-Nährlösung betrug die Differenz der α-Ketoglutaratkonzentration zu den Kontrollinsen -o,34 Mol/1oo g LFG. Eine Konzentration von $1o^{-3}$ bzw. 5 x $1o^{-3}$ M Bencyclan im Nähr-

medium ist also nicht in der Lage, den Linsenstoffwechsel positiv zu beeinflussen.

Die Tabelle 1 bzw. 2 gibt den Gehalt der Linsen an α-Ketoglutarat bzw. L-Malat nach 3-stündiger Inkubation bei 37° C unter dem Einfluß von 10^{-2} M Bencyclanhydrogenfumarat bzw. Di-Natriumfumarsäure wieder. Es sind die Mittelwerte der absoluten Metabolitkonzentrationen mit Standardabweichung in µMol/100 g LFG der Kontroll- und Versuchslinsen sowie deren prozentuale Differenz angegeben. Der t-Test bezieht sich auf die Angaben der Metabolitkonzentrationen.

Die substratfreie Vorinkubation, die für 4 Std. bei 37° C in Kinsey-B-Ringer-Lösung erfolgte, war vorgenommen worden, um die Gleichgewichtseinstellungen im Linsenstoffwechsel zu verändern, d.h. eine Art von Verarmung an endogenen Substanzen in der Linse herbeizuführen. Die Erholungsphase im TC-199-Medium mit und ohne Zusatz von 10^{-2} Bencyclan bzw. Na_2-Fumarat dauerte 3 Std. bei 37° C.

Werden frische Linsen sofort in TC-199 eingelegt, erhöht sich während einer 3-stündigen Inkubation unter Zusatz von 10 mM/l Bencyclan der α-Ketoglutaratgehalt als Mittel der paarweisen Differenzen um etwa 108 % (Tabelle 1). Werden die Linsen zuvor 4 Std. lang in Kinsey-B-Ringer inkubiert, beträgt das Mittel der paarweisen Differenz 187 % . Dieses Verhalten liegt hauptsächlich an den Werten der Kontrollinsen, bei denen durch eine 3-stündige Inkubation im TC-199-Medium nicht der Ausgangsspiegel an α-Ketoglutarat erzielt werden konnte, während die mit 10^{-2} M BCHF beeinflußten Linsen während der 3-stündigen Erholungsphase ihren Normalgehalt wieder erreichten.

Ein ähnliches Verhalten weist auch der L-Malat-Gehalt dieser Linsen auf (Tabelle 2), aber bei ihm kommt der Effekt der Vorinkubation kaum zur Geltung. Die während der 3-stündigen Erholungsphase mit BCHF inkubierten Linsen können ihren Normalgehalt zurückgewinnen; die paarweisen Differenzen liegen zwischen

1oo und 15o %.

Bei allen Versuchen, die mit Zusatz von $1o^{-2}$ M Bencyclanhydrogenfumarat zum TC-199-Medium erfolgten, konnte mit Hilfe des t-Testes gesichert werden, daß sich die Absolutwerte im Metabolitgehalt von Kontroll- und Versuchslinsen signifikant unterscheiden. Es liegt diesen Versuchen nur eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \ll o,oo1$ zugrunde.

Die Verwendung von $1o^{-2}$ M Di-Natriumfumarat als Substrat im TC-199-Medium für die Linseninkubation blieb sowohl mit wie ohne Vorinkubation ohne Erfolg auf den Gehalt an α-Ketoglutarat und L-Malat (Tabellen 1 und 2). Die prozentualen paarweisen Differenzen geben zwar eine geringe Zunahme im α-Ketoglutarat- besonders jedoch im L-Malat-Gehalt nach Inkubation mit 1o mM/l Na_2-Fumarat an, aber jedesmal ist der Wert der Standardabweichung wesentlich größer. Der durchgeführte t-Test ergab, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den α-Ketoglutarat- bzw. L-Malat-Konzentrationen von Kontroll- und Versuchslinsen besteht, denn alle erhaltenen Werte liegen oberhalb der gewählten Signifikanzschranke von $p = o,o5$. $1o^{-2}$ M Na_2-Fumarat ist also nicht in der Lage, den Linsenstoffwechsel wieder zu stabilisieren.

In Tabelle 3 sind die Werte der Regressionsgeraden $y = b_{yx} + a$ wiedergegeben. Diese Regressionsgerade gibt an, welche mathematische Beziehung zwischen der Wirkung von $1o^{-2}$ M Bencyclanhydrogenfumarat auf den Metabolitgehalt der Linsen und den Altersveränderungen des Linsenstoffwechsels besteht. Es werden die Ergebnisse der α-Ketoglutarat- bzw. der L-Malat-Konzentrationen der behandelten, der Kontrollinsen und der Differenz von beiden gegenübergestellt. Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß der Determinationskoeffizient r^2 immer $\geq o,5$ ist. Da dieser ein Maß für die Güte der Abhängigkeit zwischen der Metabolitkonzentration (y) und dem Linsenalter (x) mit und ohne Einwirkung von $1o^{-2}$ M Fludilat ^{R} ist, besteht keine lineare Beziehung zwischen dem Metabolitgehalt und dem Linsenalter.

Abbildung 5 stellt die Ergebnisse im Gehalt an α-Ketoglutarat bzw. L-Malat in Rinderlinsen bei paarweisen Versuchsansätzen gegenüber. Auf der Abszisse sind die Linsen nach α-Ketoglutarat- bzw. L-Malat-Konzentrationen geordnet, die nach 3-stündiger Inkubation in TC-199-Medium erhalten wurden. Der Wert der jeweiligen Geschwisterlinsen, die während der 3-stündigen Inkubation zusätzlich mit 1o mM/l Bencyclanhydrogenfumarat behandelt wurden, ist auf der Ordinate eingetragen. Die Werte beider Linsen wurden durch die senkrechten Linien miteinander verbunden. Wäre keine Bencyclanhydrogenfumarat-Wirkung zu verzeichnen, dann müßten die Werte auf oder in der Nähe der ausgezogenen Geraden liegen. Würden wiederum die α-Ketoglutarat- bzw. L-Malat-Konzentrationen der mit 1o mM/l Bencyclan beeinflußten Linsen im Vergleich zu den Kontrollinsen alle um denselben Betrag erhöht, müßten die Endpunkte der Ordinate auf einer Parallelen zu der ausgezogenen Geraden liegen.

Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß besonders niedrige Metabolitkonzentrationen durch $1o^{-2}$ M Bencyclan günstig beeinflußt werden.

Tabelle 1 Gehalt von Rinderlinsen an α-Ketoglutarat nach Inkubation in verschiedenen Nährmedien

Inkubation in	n	α-Ketoglutaratgehalt ($\bar{x}$) Kontrolle	α-Ketoglutaratgehalt ($\bar{x}$) BCHF bzw. Na_2- Fumarat	Δ %	p
TC 199 bzw. 10^{-2} M BCHF	23	1,06 ± 0,41	2,02 ± 0,38	+ 107,9 ± 93,6	≪ 0,001
4 Std.Kinsey-B -R. + TC 199 bzw. 10^{-2} M BCHF	18	0,57 ± 0,27	1,38 ± 0,38	+ 187,8 ± 123,7	≪ 0,001
TC 199 bzw. 10^{-2} M Na_2-Fumarat	27	1,02 ± 0,34	1,15 ± 0,34	+ 23,7 ± 53,6	0,3 - 0,2
4 Std. Kinsey-B -R. + TC 199 bzw. 10^{-2} M Na_2-Fumarat	16	0,73 ± 0,46	0,95 ± 0,38	+ 92,3 ± 212,7	0,2 - 0,1

n : Anzahl der Messungen; $\bar{x}$: Mittelwert in µMol/100 g LFG
Δ % : prozentuale Differenz von $\bar{x}$ der Kontroll- und Versuchslinsen;
p : Irrtumswahrscheinlichkeit

Tabelle 2 Gehalt von Rinderlinsen an L-Malat nach Inkubation in verschiedenen Nährmedien

Inkubation in	n	L-Malatgehalt ($\bar{x}$) Kontrolle	BCHF bzw. Na_2-Fumarat	Δ %	p
TC 199 bzw. 10^{-2} M BCHF	12	23,08 ± 6,54	52,20 ± 5,24	+ 153,0 ± 94,3	$\ll$ 0,001
4 Std. Kinsey-B -R. + TC 199 bzw. 10^{-2} M BCHF	18	41,52 ± 8,96	80,52 ± 14,02	+ 97,5 ± 42,8	$\ll$ 0,001
TC 199 bzw. 10^{-2} M Na_2-Fumarat	18	28,64 ± 7,88	32,24 ± 10,90	+ 12,8 ± 17,1	0,3 - 0,2
4 Std. Kinsey-B -R. + TC 199 bzw. 10^{-2} Na_2-Fumarat	18	26,30 ± 8,13	26,60 ± 7,60	+ 18,7 ± 30,9	0,3 - 0,2

Tabelle 3 Werte der Regressionsgeraden $y = b_{yx}\, x + a$

und des Determinationskoeffizienten r^2

Metabolitkonzentration von	Inkubation in	Meßgrößen	b_{yx}	a	r^2
α-KETOGLUTARAT	BCHF (10^{-2} M)		0,0025	0,93	0,0017
		Kontrollinse	0,07	0,41	0,5
		behandelte Linse	0,02	1,58	0,07
	4 Std. Kinsey-B-Ringer + BCHF (10^{-2} M)		-0,007	0,84	0,003
		Kontrollinse	0,003	0,56	0,0006
		behandelte Linse	0,01	1,33	0,007
L-MALAT	BCHF (10^{-2} M)		0,42	28,50	0,03
		Kontrollinse	-0,22	24,62	0,01
		behandelte Linse	0,1	52,02	0,04
	4 Std. Kinsey-B-Ringer + BCHF (10^{-2} M)		-2,61	51,13	0,21
		Kontrollinse	-1,14	47,41	0,06
		behandelte Linse	-3,1	96,79	0,35

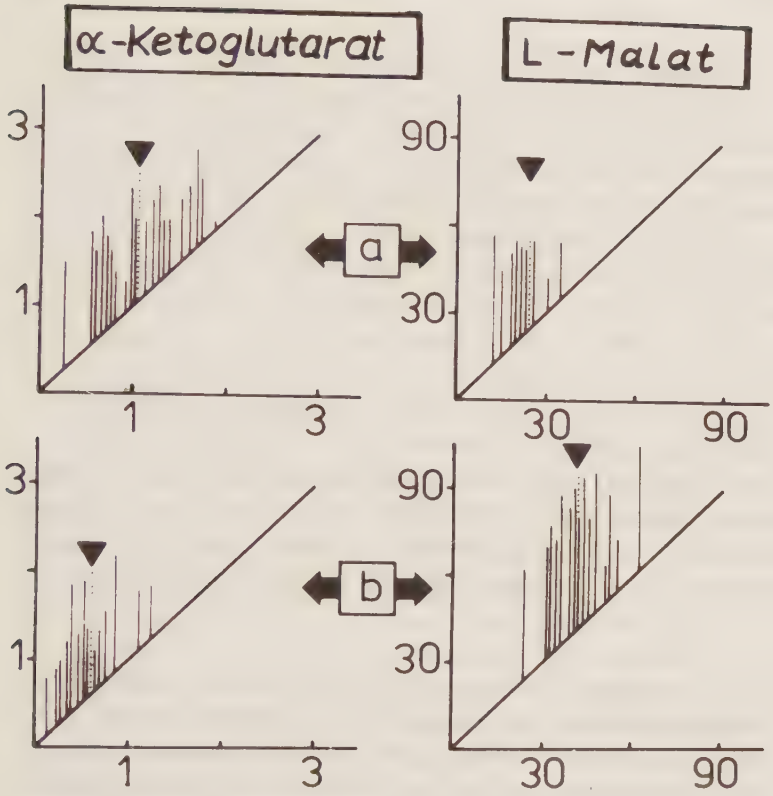


Abbildung 5 :

Gehalt der Rinderlinsen an α-Ketoglutarsäure und L-Malat
Gegenüberstellung der Ergebnisse bei paarweisem Versuch
Abszisse: α-Ketoglutarat- bzw. L-Malat-Gehalt ohne 10^{-2} M BCHF
(µ Mol/100 g LFG)
Ordinate: α-Ketoglutarat- bzw. L-Malat-Gehalt mit 10^{-2} M BCHF
(µ Mol/100 g LFG)
.....◀ Mittelwert
a) ohne Vorinkubation
b) Vorinkubation für 4 Std. bei 37°C in Kinsey-B-Ringer-Lösung

4. Diskussion

Es besteht heutzutage wohl kein Zweifel mehr darüber, daß der Zitronensäurezyklus der Linse ein bedeutsamer und für den Energiehaushalt effektiver Stoffwechselweg ist. Verschiedentlich sind Untersuchungen über die Fähigkeit dieses Zyklus zur Metabolisierung von Substraten unternommen worden. So werden in den Zitratzyklus die Endprodukte zahlreicher kataboler Stoffwechselwege wie z.B. Aminosäuren, besonders Aspartat und Glutamat (Trayhurn, 1972; Trayhurn & van Heyningen, 1971a, 1973), und endogene Lipide (Werner, 1969) eingeschleust.

An Homogenaten waren derartige Versuche bereits von Kleifeld et al. (1956) und Kleifeld & Hockwin (1956) benutzt worden, um nicht nur die Fähigkeit zur Metabolisierung, sondern auch eine Stoffwechselrelevanz dieser Reaktionen aufzuzeigen. Dabei wurde u.a. nachgewiesen, daß in Gegenwart von Pyruvat eine beachtliche Einbaurate von $^{32}PO_4^{3-}$ in die ATP ($AT^{32}P$) beobachtet werden konnte.

Am Modell des reversible cation shift (Harris et al., 1951, 1953, 1954 a,b) haben Heinrichs & Harris (1956) an ganzen Linsen die Wiederherstellung des physiologischen Na^+/ K^+-Gleichgewichtes untersucht und gefunden, daß Zusätze von Acetat, Pyruvat oder α-Ketoglutarsäure die Glucose als Substrat zwar nicht gleichwertig ersetzen können, Teilerholungen wurden aber sichtbar. Diese wären sicherlich überhaupt nicht eingetreten, hätten die Substanzen keinen Einfluß auf den Stoffwechsel gehabt.

Nachdem Untersuchungen mit Bencyclanhydrogenfumarat (BCHF) an Linsenhomogenaten (Hockwin et al., 1977) und intakten Linsen von Rindern (Hockwin et al., 1978) Ergebnisse gezeigt hatten, die für eine Aktivierung von Prozessen des Kohlenhydratabbaus mit der Fähigkeit zur Besserung der Energiebilanz durch die Metabolisierung des im BCHF enthaltenen Fumarat-Anteils sprechen (Korte et al., 1977), wurde jetzt geprüft, ob dabei Veränderun-

gen im Gehalt an α-Ketoglutarsäure (α-KG) und Apfelsäure sichtbar werden

Am Modell der durch entsprechende in vitro Inkubation substratverarmten Linse mit Verschiebungen der physiologischen Stoffwechselgleichgewichte (Hockwin et al., 1978) wurde gefunden, daß BCHF als Substrat zur Auffüllung der Metabolitspiegel im Zitronensäurezyklus metabolisiert werden kann. Die Werte für den L-Malat-Gehalt, die in der Größenordnung mit den Angaben von Krause & Stack (1939) übereinstimmen, sind in Gegenwart von BCHF signifikant höher als in den Linsen, die nach sonst gleicher Vorbehandlung in TC 199 aufbewahrt wurden. Dabei wird offenbar der physiologische Spiegel nicht überschritten; ein Speichern von L-Malat findet nicht statt.

Nach weiteren Umsetzungen im Zitratzyklus (Malat ⟶ Oxalacetat Zitrat ⟶ cis-Aconitat ⟶ Iso-Zitrat) wird die Stufe des α-Ketoglutarats erreicht, die ein wichtiges Bindeglied für die Aminosäureverwertbarkeit ist. Aus Untersuchungen von Paulus (1961) und Radetzky (1970) geht hervor, daß der α-KG-Gehalt in Rinderlinsen etwa 1 - 2 µMol/100 g beträgt. Die in der Tabelle 1 angegebenen Werte liegen in der gleichen Größenordnung. Anders als beim L-Malat ist der α-KG-Gehalt sehr von den Inkubationsbedingungen abhängig. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß eine 3-stündige Inkubation in TC 199 nicht ausreicht, um den während der substratfreien Vorinkubation abgesunkenen α-KG-Spiegel wieder zu normalisieren. Erst ein Zusatz von 10^{-2} M BCHF ermöglicht die Normalisierung selbst dann, wenn nach 4-stündiger Vorinkubation der α-KG-Gehalt auf etwa die Hälfte abgesunken war.

Wie frühere Befunde zeigten (Loth, 1976; Hockwin et al., 1977), ist durch Erhöhung des Glucosesubstratangebotes bei gleichbleibender BCHF-Konzentration eine zusätzliche Steigerung des O_2-Verbrauches und der CO_2-Bildung zu erzielen. Das Verhalten des α-Ketoglutaratspiegels spricht ebenfalls für eine Aktivierung der Glucoseverwertbarkeit durch BCHF.

TC 199 enthält 1 g Glucose je Liter Nährmedium. Diese Menge oder das Medium generell reicht offensichtlich nicht aus, um innerhalb von 3 Stunden die ursprünglichen Metabolitspiegel im Zitratzyklus wiederherzustellen. Dies wird aber in Gegenwart von BCHF möglich: L-Malat und auch α-Ketoglutarat erreichen während der Inkubationszeit wieder ihre Normalwerte. Damit wird wohl die Voraussetzung geschaffen, daß genügend Carriermoleküle im Zitronensäurezyklus vorhanden sind, damit er seiner metabolischen Hauptaufgabe nachkommen und für die Energiebereitstellung in Form von ATP funktionsfähig sein kann.

Die Normalisierung der Metabolitspiegel im Zitronensäurezyklus durch den Glucoseabbau allein ist ein langwieriger Prozeß, da die Phosphorylierungsreaktionen mittels der Hexokinase und Phosphofructokinase (Hockwin et al., 1978) zusätzlich noch durch den im Hungerzustand bestehenden ATP-Mangel limitiert werden (Hockwin et al., 1978). Die Verwertbarkeit des Fumarsäureanteils im Bencyclan als Metabolit im Zitronensäurezyklus (Korte et al., 1977,a) regeneriert jedoch dieses energetisch so effektive System und schafft damit die Grundlage für eine rasche Bereitstellung von Stoffwechselenergie. Dies kann bereits im ATP-Gehalt von Rinderlinsen bei Zugabe von o,1 mM/l BCHF zum TC 199-Nährmedium nach 2-stündiger Erholungsinkubation gesehen werden. Er ist gegenüber den ohne BCHF-inkubierten Linsen signifikant erhöht und die Konzentrationen der glykolytischen Zwischenstufen weisen auf einen erhöhten Glucoseumsatz hin (Hockwin et al., 1978).

Bis jetzt gibt es keine Erklärung dafür, warum mit dem Di-Natriumsalz der Fumarsäure die beim Bencyclanhydrogenfumarat beobachteten Effekte nur angedeutet sichtbar sind oder ganz ausbleiben. Die geringen Erhöhungen der Metabolitspiegel an α-KG und L-Malat waren jedesmal ohne statistische Signifikanz. Möglicherweise spielt die unterschiedliche Permeationsfähigkeit der Substanzen eine entscheidende Rolle. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß das Bencyclan eine membranstabilisierende Wirkung ausübt und an Erythrozytenmembranen die Lipidstruktur verändert (Mányai, 1974). Über das Di-Natriumfumarat wurde

bis jetzt nichts ähnliches berichtet.

Die Versuche zeigen die Bedeutung des Zitronensäurezyklus für den Energiehaushalt der Linse. Sie geben Hinweise dafür, daß Störungen der Metabolitspiegel im Tricarbonsäurezyklus durch Zusatz von Bencyclanhydrogenfumarat und dessen Abbau ausgeglichen werden können, wie am Beispiel des α-Ketoglutarat und des L-Malat gezeigt wird. Hierin besteht ein entscheidender Beitrag zur Normalisierung gestörter Stoffwechselgleichgewichte mit Besserung der Energiebilanz.

5. Zusammenfassung

Paarweise Inkubation von Rinderlinsen in TC 199 in Gegenwart von Bencyclanhydrogenfumarat (BCHF) führt durch Metabolisierung des im BCHF enthaltenen Fumaratrestes zu einer Erhöhung der Metabolitspiegel von L-Malat und α-Ketoglutarat gegenüber den ohne Fludilat ^{R} -Zusatz aufbewahrten Linsen. Dies läßt sich besonders nach entsprechender Vorinkubation unter endogener Substratverarmung zeigen.

Die Zugabe von Di-Natriumfumarat bleibt nahezu ohne Wirkung, was möglicherweise auf unterschiedliche Permeationseigenschaften gegenüber dem BCHF zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die früher beschriebene Aktivierung von Prozessen des Kohlenhydratstoffwechsels durch Fludilat ^{R} von dessen Verwertbarkeit als Substrat für den Zitronensäurezyklus ausgeht.

6. Literaturverzeichnis

Alant, C.; Horváth, N.
Erfahrungen mit Bencyclan bei peripheren Störungen der arteriellen Blutversorgung
Arzneim.-Forsch. 2o, 1o a, 14o3 - 14o5 (197o)

Aviram, A.; M. Schalitt; N. Kassem; J.Y.Groen
Glucose utilization, glutathione, potassium and sodium content of the isolated bovine lens
Clin.Chem.Acta, 14, 442 - 449 (1966)

Bergmeyer, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse, 3.Auflage,
Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße, Bd.I, 111 - 116, 333 (1974)

Blum, G.
Versuch einer Bilanzierung der Kohlenhydratabbauwege in Kälber- und Kaninchenlinsen
Diss., Bonn 1969

Bonting, S.L.; L.L.Caravaggio; N.M.Hawkins
Studies on sodium-potassium-activitated adenosinetriphosphatase: V. Correlation of enzyme activity and cation flux in six tissues
Arch. Biochem. Biophys., 1o1, 37 - 46 (1963)

Bours, J.; K. Doepfmer; O. Hockwin
Isoelectric focussing of cristallins from different parts of the bovine and dog lens in dependance on age
Doc. Ophthal. Proc. Ser. 8, 75 - 89 (1976)

Bours, J.; O. Hockwin
Charakterisierung der wasserlöslichen Proteine der Linse mittels Immunologie und Isoelektrofokussierung und ihre Beziehung zum Alterungsprozeß
Klin. Mbl. Augenheilkunde, 17o, 51 - 59 (1977)

Bours, J.; A. Weber; O. Hockwin
The cristallin distribution of the bovine lens during aging, in: Symp. Biology of the epithelial lens cells in relation to development, aging and cataract
Editions Inserm (Paris), 6o, 2o5 - 213 (1976 b)

Bucher, O.
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 8. Auflage; Bern, Stuttgart, Wien (1973)

Buddecke, E.
Grundriß der Biochemie,
2. Auflage, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 148 - 186, 239 - 257 (1971)

Clauß, G.; H. Ebner
Grundlagen der Statistik
2. Auflage, Verlag Harri Deutsch; Zürich, Frankfurt a. M. (1975)

Dardenne, U.; G. Drechseler
Die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase in tierischen und menschlichen Augenlinsen
Albr. v. Graefes Arch. Ophthal., 164, 156 - 162 (1961)

Dardenne, U.; O. Hockwin
Änderungen des Linsenstoffwechsels in Abhängigkeit vom Lebensalter
Fortschr. Augenheilkunde; Basel, New York, Vol.17, 172 - 184 (1966)

Denk, H.
Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Bencyclan
W M W 123, Nr. 11, 174 - 178 (1973)

Dinkhoff, U.; Schmidt, B.
Fludilat bei Durchblutungsstörungen des Auges
Therapiewoche 25, 38, 5417 (1975)

Ely, L.O.
The oxidation of the lactic acid, pyruvic acid and various members of the citric acid circle by bovine lens homogenates
Amer. J. Ophthal.,34, 127 - 13o (1951)

Ely, L.O.; W.A. Robbie
The cyanide sensitivity and cytochrome-c-content of the cristalline lens
Amer. J. Ophthal.,33, 269 - 272 (195o)

Faragó, E.; J. Simon
Tierexperimentelle Untersuchungen über die Verteilung von Bencyclan im lebenden Organismus
Arzneim.-Forsch. 2o, 1o a, 1385 - 1387 (197o)

Fischer, F.P.
Die reduzierenden Substanzen der Linse
Arch. Augenheilkunde 1o8, 527 - 543 (1934)

Födö, V.
Die ophthalmologische Anwendung von Bencyclan und die ophthalmodynamometrische Registrierung und seine Wirkung auf die Gefäße des Gehirns
Arzneim.-Forsch. 2o, 1o a, 145o - 1453 (197o)

Gärtner, E.; H.G. Enzenroß; V. Vlahov; P. Schanzenbächer; H. Brandt; E. Betz
Durchblutung, Sauerstoffdruck und pH des cerebralen Kortex unter Einwirkung von Bencyclan
Arzneim.-Forsch. 25, 6, 887 (1975)

Gutmann, J.; A.W. Wahlefeld
In: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße, Bd. II, 1632 - 1635 (1974)

Hapke, H.J.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Charakterisierung zentralnervöser Wirkungen von Bencyclan
Archives internationales de Pharmacodyamie et de Thérapie
Vol. 2o2, 2, 231 - 243 (1973)

Hapke, H.J.
Wirkung von Fludilat auf die Blut-Hirn-Schranke
Therapiewoche 24, 25, 29oo (1974)

Harris, J.E.; L.B. Gehrsitz
Significance of changes in Potassium and Sodium content of the Lens: a mechanism for lenticular intumescence
Amer. J. Ophthal., 34 (II), 131 - 138 (1951)

Harris, J.E.; L.B. Gehrsitz; L.T. Nordquist
The in vitro reversal of the lenticular cation shift induced by cold or calcium defiency
Amer. J. Ophthal., 36 (II), 39 - 5o (1953)

Harris, J.E.; J.D. Hauschildt; L.T. Nordquist
Lens metabolism as studied with the reversible cation shift
I. The role of glucose
Amer. J. Ophthal., 38 (II), 141 - 147 (1954 a)

Harris, J.E.; J.D. Hauschildt; L.T. Nordquist
Lens metabolism as studied with the reversible cation shift
II. The effect of oxygen and glutamic acid
Amer. J. Ophthal., 38 (II), 148 - 152 (1954 b)

Heidrich, H.
Vasodilatantien als Antidiabetika
81. Tagg. Dtsch. Ges. inn. Med.,
Wiesbaden, 6. - 1o. April 1975

Heinrichs, D.; J.E. Harris
Lens metabolism with the reversible cation shift
IV. The ability of various metabolites to replace glucose
Amer. J. Ophthal., 42, 358 - 362 (1956)

van Heyningen, R.
Active transport and osmotic regulation in the lens,
in: Davson, H.: The Eye, Vol. I, Academic Press New York and London, 411 - 425 (1969)

Hockwin, O.
Untersuchungen des Phosphatstoffwechsels in Linsen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie
Albr. v.Graefes Arch. Ophthal., 162, 339 - 345 (1960)

Hockwin, O.
Experimenteller Beitrag zur Wirkung von Röntgenstrahlen auf Stoffwechselabläufe der Augenlinse in Abhängigkeit vom Lebensalter
Habilitationsschrift, Bonn, 1961; Fortschr. Medizin, 80, 659 - 666 (1961)

Hockwin, O.
Early changes of lens meatbolism after X-irridation
Exp. Eye Res., 1, 422 - 426 (1962 b)

Hockwin, O.
Age changes of lens metabolism, in: Altern und Entwicklung, Akademie der Wissenschaften und Literatur, Mainz, Hrsg.: H. Bredt und G.W. Rohen, New York, Schattauer Verlag, Bd. I, 95 - 129 (1971)

Hockwin, O.
Zur Wirkungsweise des Fludilat auf Vorgänge des Kohlenhydratstoffwechsels
Fortschr. Medizin, 95, 29, 1837 - 1840 (1977)

Hockwin, O.; H.D. Bergeder; T. Okamoto, et al.
Kataraktentstehung durch Addition verschiedener Einflußfaktoren, Sitzungsbericht der 118. Versammlung des Vereins Rhein. Westf. Augenärzte (1968)

Hockwin, O.; G. Blum; I. Korte, et al.
Studies on the citric acid cycle and its portion of glucose break-down by calf and bovine lenses in vitro
Ophthal. Res., 2, 143 - 148 (1971)

Hockwin, O.; O. Kleifeld; P. Arens
Einfluß des Kaliumcyanids und der Monojodessigsäure auf den Stoffwechsel der Linse
Albr. v.Graefes Arch. klin. exp. Ophthal., 158, 47 - 53 (1956)

Hockwin, O.; H.-R. Koch; C. Ohrloff; J. Bours
Altern der Linse und Kataraktentstehung
Klin. Mbl. Augenheilkunde, 169, 165 - 181 (1976)

Hockwin, O.; I. Korte
Biochemistry of various catabolic pathways of the lens
Symp. Biochemistry of the Eye, Tutzing Castle, 1966.
Karger, Basel, New York, 216 - 225 (1968)

Hockwin, O.; I. Korte; R. Breuer, et al.
Modell zur Untersuchung der Substratverwertbarkeit von Substanzen für den Energiestoffwechsel am Beispiel des Bencyclan-Hydrogenfumarat
Albr. v.Graefes Arch. klin. exp. Ophthal., 207, 169 - 180 (1978)

Hockwin, O.; I.Korte; C. Loth, et al.
Action of Bencyclanehydrogenfumarate on the Carbohydrate Metabolism of Bovine Lens Homogenates
Arzneim.-Forsch., 27 (II), 7, 1417 - 1420 (1977)

Hockwin, O.; I. Korte; T. Murata, et al.
Untersuchungen über den Anteil des Zitronensäurezyklus am Kohlenhydratabbau der Linse
Ber. dtsch. ophthal. Ges., 7o, 35o - 354 (1969)

Hockwin, O.; C. Chrloff; J. Jeschke
Hexokinase activity of bovine lenses
ARVO-Report, Sarasota Fla. 1976, Lens Section: Cataract and Lens Metabolism, Nr. 1o, 23 P (1976)

Hockwin, O.; N. Poonavalla; E. Noll; W. Licht
Durchlässigkeit der isolierten Rinderlinsenkapsel für Aminosäuren und wasserlösliche Eiweiße
Albr. v.Graefes Arch. klin. exp. Ophthal., 188, 175 - 181 (1973 b)

Hockwin, O.; B. Schaefer
Über den Glykogengehalt in Linsen, Linsenrinde, Linsenkern verschieden alter Rinder
Ber. dtsch. ophthal. Ges., 7o, 368 - 375 (1963)

Hockwin, O.; L. Weimar; E. Noll; W. Licht
Fermentaktivitäten in der vorderen Schale, der hinteren Schale, dem Äquator und Kern unterschiedlich alter Rinderlinsen
Albr. v.Graefes Arch. Ophthal., 17o, 99 - 116 (1966 a)

Hollwich, F.
Augenheilkunde, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 116 - 131 (1976)

Hoyer, S.
Wirkung von Fludilat auf die cerebralen Stoffwechselparameter
Therapiewoche, Fludilat Symp. Fuschl, 3o -31 (1973)

Huysmans, J.A.; F.P. Fischer
Über den Gasstoffwechsel der Linse und des Glaskörpers
Ophthalmologica (Basel), 1o2, 275 - 286 (1941)

Kemper, D.; E. Tenfelde
Verhalten von Bencyclan an der Blut-Hirn-Schranke
Therapiewoche, 33, (1974)

Kinoshita, J.H.
Carbohydrate metabolism of the lens
A. M. A. Arch. Ophthal., 54, 36o - 368 (1955)

Kinsey, V.E.
Amino acid transport in the lens
Invest. Ophthal., 4, 691 - 699 (1965 a)

Kinsey, V.E.; C. Wachtl; M. Constant; E. Camacho
Studies on the cristalline lens:
VI. Mitotic activity in the epithelia of lenses cultured in various media
Amer. J. Ophthal., 4o (II), 216 - 223 (1955)

Kiss, T.; T. Smolenszky; J. Lelkes; M. Tekeres
Die Wirkung der Vasodilatatoren Bencyclan und Tolazolin auf die Muskeldurchblutung im pharmakologischen und klinischen Experiment
Therapiewoche, 22, 35, 2791 (1972)

Kleifeld, O.
Untersuchungen der Abhängigkeit der sichtbaren Veränderungen von Linse und Linsenfasern von den elektrischen Reizbedingungen
Albr. v.Graefes Arch. Ophthal., 154, 332 - 347 (1953)

Kleifeld, O.; P. Arens; O. Hockwin
Gibt es einen Tätigkeitsstoffwechsel der Linse?
Albr. v.Graefes Arch. Ophthal., 156, 467 - 479 (1955 b)

Kleifeld, O.; N. Ayberk; O. Hockwin
Über die Fähigkeit zur ATP-Bildung in Extrakten von Linsen junger und alter Tiere
Albr. v.Graefes Arch. Ophthal., 158, 34 - 38 (1956)

Kleifeld, O.; W. Emmes; O. Hockwin
Histochemische Untersuchungen von Dehydrogenasen in Linsen verschiedener Tierarten
Ber. dtsch. ophthal. Ges., 69, 462 - 465 (1968)

Kleifeld, O.; O. Hockwin
Über den Kohlenhydratstoffwechsel der Linse in Abhängigkeit vom Lebensalter und bei experimentell erzeugten Stoffwechselstörungen
Ber. dtsch. ophthal. Ges., 6o, 1o1 - 1o8 (1956)

Korte, I.
In vitro-Inkubation von Augenlinsen, in: Arzneimittelnebenwirkungen am Auge
Hrsg.: O. Hockwin und H.-R. Koch, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 281 - 293 (1977)

Korte, I.; O. Hockwin
Studies on the citric acid cycle and its portion of glucose breakdown by calf and bovine lenses in vitro
Lens Symposium Utrecht, 1971, Ophthal. Res., 3, 13 (1972)

Korte, I.; O. Hockwin
Content in adenosin-tri-di- and monophosphate in bovine lens homogenate incubated in Ringer solution and after addition of fructose-1.6.-diphosphate
3rd Int. Congr. for Eye Research, Osaka, Japan 1978 b

Korte, I.; O. Hockwin; C. Ohrloff, u.a.
Bestimmung des K_M-Wertes der Fumarase (E.C.4.2.1.2.) mit Bencyclan-hydrogenfumarat als Substrat
Arzneimittel-Forschung, 27, II, 1532 - 1534 (1977 a)

Korte, I.; O. Hockwin; W. Schmack; G. Cremer-Bartels
Weitere Untersuchungen zur in vitro-Aufbewahrung von Augenlinsen
Albr. v.Graefes Arch. klin. exp. Ophthal., 175,
235 - 241 (1968 b)

Korte, I.; C. Loth; O. Hockwin, C. Ohrloff
The effect of N-((-3-(1-Benzyl-cyclo-heptyloxy)-propyl))- -N, N-dimethyl-ammonium-hydrogenfumarate (Fludilat R) on the gas exchange of lens homogenates
Exp. Eye Res., 24, 98 (1977 b)

Kuck, I.F.R., jr.
Carbohydrate Metabolism, in:
Biochemistry of the Eye, Ch.4, Edited by:
M. Graymore, Academic Press, London and New York, 265 -277 (197o)

Krause, A.C.; A.M. Stack
Citric and malic acid of the ocular tissues
Arch. Ophthal., (Chicago), 22, 66 - 72 (1939)

Lengyel, E.; Bálint, T.; Drietomszky, J.; Duray, A.; Fráter, R.; Gáll, J.; Wagner, E.
Gerontologische Bewertung der Wirkung von Bencyclan
Arzneim.-Forsch., 2o, 1o a, 1445 - 1448 (197o)

Leonard, W.
Erfahrungen mit der intraarteriellen Fludilat-Therapie
Herz/Kreislauf, 5, 4, 27 (1973)

Leydhecker, W.; Waller, W.; Kriegelstein, G.
Die Wirkung gefäßerweiternder Medikamente auf den i.o.-Druck
Klin. Mbl. Augenheilkunde, 164, 293 - 297 (1974)

Loth, C.
Die Wirkung von N-((3-(L-Benzyl-cycloheptyloxy)-propyl))-N, N-dimethyl-ammonium-hydrogenfumarat (Fludilat R) auf den Gasstoffwechsel von Rinderlinsenhomogenaten
Diss., Med. Fakultät der Univ. Bonn (1976)

Lütkes, G.
Untersuchungen über die Fähigkeit von Fruktose-1,6-Diphosphat die Kapsel von Rinderlinsen und die Hornhaut beim Kaninchen zu durchdringen
Diss., Med. Fakultät der Univ. Bonn (1979)

Mann, S.
Untersuchungen der Phosphatchemie und Kinetik des Kohlenhydrat- und Nukleotidstoffwechsels mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie in Kombination mit der Radioisotopenmethode, Polarographie und Papierchromatographie
Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Univ. Bonn (1959)

Mányai, S.
Die Wirkung von Bencyclan auf Erythrozytenmembranen
Therapiewoche, 24, 25, 2877 (1974)

Méhes, G.; F. Varga
Die Wirkung von Bencyclan auf den Blutzuckerspiegel, Diurese und Kochsalzausscheidung
Arzneim.-Forsch., 2o, 1o a, 1373 - 1374 (197o)

Merriam, F.C.; V.E. Kinsey
Studies on the cristalline lens.
I. Technic for in vitro culture of cristalline lenses and observation on metabolism of the lens
Arch. Ophthal., Chicago, 43, 979 - 988 (195o)

Müller, H.K.; O. Hockwin; U. Dardenne
Über den Stoffwechsel der Linse
Almanach der Augenheilkunde, 1964, G.F. Lehmanns Verlag, München, 1o2 - 119 (1964)

Murata T.; O. Hockwin
Der Gehalt der Citronensäure in Linsen und einzelnen Linsenteilen unterschiedlich alter Rinder
Albr. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal., 179, 32 - 4o (1969)

Ohrloff, C.; C. Stoffel; H.-R. Koch, u.a.
Experimetal cataracts induced by tryptophanefree diet
Exp. Eye Res., 2o, 179 - 18o (1975)

Paulus, W.
Untersuchungen über den Gehalt an α-Ketoglutarsäure in Rinde und Kern verschieden alter Rinderlinsen
Albr. v.Graefes Arch. Ophthal., 163, 32o - 323 (1961)

Pirie, A.
Glutathione peroxydase in lens and a source of hydrogen peroxide in aqueous humor
Biochem. J., 96, 244 , 353 (1965)

Radetzky, W.
Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel von Linsen nach Aufbewahrung in Nährlösungen mit unterschiedlichem O_2-Partialdruck
Diss., Med. Fakultät der Univ. Bonn (197o)

Sachs, E.
Statistische Auswertungsmethoden,
2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg (1969)

Salminen, L.; O. Hockwin; R. Ismail
Spezielle Probleme der Ophthalmo-Pharmakokinetik, in:
Arzneimittelwirkungen am Auge
Hrsg.: O. Hockwin, H.-R. Koch, Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart/ New York, 1 - 12 (1977)

Schanzenbächer, P.
Die Wirkung von Bencyclan auf den Gehirnkreislauf
Diss., Tübingen (1976)

Schmack, W.; S. Ong; J.A. Shah
Über den Sorbitweg der Linse
Ber. dtsch. ophthal. Ges., 65, 3o3 - 3o7 (1963)

Schmidt-Schönbein, H.; J. Weiß; M. Brandhuber
Der Einfluß von Bencyclan auf das Fließverhalten von Erythrozyten und Vollblut
Herz/Kreislauf, 7, 9, 475 - 48o (1975)

Schmutter, J.
Untersuchungen über die Altersabhängigkeit des Gewichts und des Volumens von Rinderlinsen
Diss., Med. Fakultät der Univ. Bonn (1961)

Schwartz, B.
A critical analysis of the closed system technique for the culture of the lens
Arch. Ophthal. Chicago, 63, 593 - 6o6 (196o a)

Schwartz, B.
The design and performance of a perfusion system for the culture of the lens
Arch. Ophthal. Chicago, 63, 6o7 - 624 (196o b)

Solti, F.
Die Wirkung von Bencyclan auf die Blutdurchströmung der Extremitäten
Arzneim.-Forsch., 2o, 1o a, 1358 - 136o (197o)

Spaan, G.; R. Hild
Veränderungen einiger Stoffwechselparameter in der ischämischen Extremität durch Fludilat
Therapiewoche, 24, 25, 2833 (1974)

Szekeres, L.
Die haemodynamische Wirkung von Bencyclan
Arzneim.-Forsch., 2o, 1o a, 1362 - 1367 (197o)

Tenfelde, E.
Untersuchungen mit Bencyclan an der Blut-Hirn-Schranke
Diss., Münster (1974)

Thiemann (Arzneimittel)
Fludilat R, Fludilat R retard
Zur Therapie cerebraler und peripherer Durchblutungsstörungen
Arzneimittelprospekt, 7. Auflage (1976)

Trayhurn, P.
Metabolism of the citric acid cycle amino acids in the bovine lens
Ophthal. Res., 3, 13 (1972)

Trayhurn, P.; R. van Heyningen
The metabolism of glutamin in the bovine lens: Glutamin as a source of glutamat
Exp. Eye Res., 17, 149 - 154 (1973)

Trayhurn, P.; R. van Heyningen
Metabolism of glutamate aspartate and alanine in the bovine lens
Biochem. J., 142, 72 (1971 a)

Trayhurn, P.; R. van Heyningen
The role of respiration in the energy metabolism of the bovine lens
Biochem. J., 129, 5o7 - 5o9 (1972)

Waley, S.G.
Function and Macromolecular Composition, in:
Davson, H.,
The Eye,
Vol. I, Academic Press New York and London, 299 - 369 (1969)

Wallenfels, K.; W. Christian, in: Bergmeyer, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse
3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
Bd. II, 1624 - 1627 (1974)

Weber, D.
Über die mittlere Lebensdauer von Linseneiweißen, untersucht am lebendigen Kaninchen
Ber. dtsch. ophthal. Ges., 64, 296 - 299 (1961)

Weigelin, E.; A. Lobstein
Ophthalmodynamometrie
Verlag S. Karger, Basel (1962)

Werner, H.
Oxidation of ^{14}C-labelled endogenous lipids by intact rabbit lenses
Ass. Res. Ophthal., Sarasota, April 1969

7. Lebenslauf

13. 2. 1955	Geburt als 2. Kind des Verwaltungsangestellten Anton Günter und seiner Ehefrau Margret Günter, geb. Witte, in Paderborn
April 1961	Grundschule, Karlschule Paderborn
April 1965	Privates, neusprachliches Mädchengymnasium St. Michael, Paderborn
Mai 1973	Abitur
Oktober 1973	Beginn des Medizinstudiums an der Ruhruniversität Bochum
August 1975	Physikum in Bochum
Oktober 1975	Klinikum Essen
August 1976	1. ärztliche Prüfung in Essen
Oktober 1976	Klinikum Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
März 1979	2. ärztliche Prüfung in Bonn
April 1979	Beginn des Praktischen Jahres in der Universitätsklinik Bonn
April 198o	Staatsexamen der Medizin in Bonn
Juni 198o	Erteilung der Approbation